



# Identification et caracterisation des Glutaredoxines de la cyanobacterie Synechocystis

Benoit Marteyn

## ► To cite this version:

Benoit Marteyn. Identification et caracterisation des Glutaredoxines de la cyanobacterie Synechocystis. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. NNT : . tel-00104387

**HAL Id: tel-00104387**

**<https://theses.hal.science/tel-00104387>**

Submitted on 6 Oct 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Paris XI**  
Centre Scientifique d'Orsay

91405 ORSAY Cedex  
Ecole Doctorale Gène Génome Cellule

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY  
Spécialité : Physiologie et génétique des micro-organismes

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Benoît MARTEYN**

**Le 16 décembre 2005**

**Rôle des glutarédoxines dans la tolérance aux stress oxydant et  
métalliques chez *Synechocystis***

**Directeur de thèse : Dr Franck CHAUVAT (CEA/SBMS)**

**Jury**

Dr. Nicole TANDEAU DE MARSAC	Présidente
Dr. Mickael DUBOW	Rapporteur
Dr. Jean-Claude DRAPIER	Rapporteur
Dr. Fabrice CONFALONIERI	Examineur
Dr. Franck CHAUVAT	Examineur

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Pierre LEGRAIN, chef du département DBJC, qui m'a permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie Michel TOLEDANO, chef du Service de Biologie Moléculaire Systémique, de m'avoir accueilli dans son service, soutenu et orienté dans la conclusion de ce travail.

Je remercie la direction du programme « Toxicologie Nucléaire » Jean-Jacques LEGUAY et Marie-Thérèse MENAGER d'avoir financé mon projet et donné une perspective élargie à mon travail de thèse.

Je remercie Franck CHAUVAT de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et celles de la recherche. Il m'a appris à confronter mes idées pour les rendre toujours plus pertinentes. J'associe bien évidemment Corinne CASSIER-CHAUVAT à ces remerciements pour sa disponibilité et ses idées toujours pertinentes.

Je remercie Fabrice CONFALONIERI d'avoir accepté d'être le président de mon jury, Mickael DUBOW et Jean-Claude DRAPIER d'être mes rapporteurs et Nicole TANDEAU DE MARSAC d'être mon examinateur.

Je remercie Ömer POYRAZ, mein Freund, qui a grandement participé à la réalisation de ce travail. Son organisation et sa rigueur devraient être enseignées dans toutes les bonnes écoles et universités. Je lui souhaite une bonne fin de thèse et espère le recroiser prochainement sur l'axe Paris-Berlin. « Viel Glück für die Zukunft ! ».

J'ai passé quatre années à travailler en collaboration étroite avec Francis, Laetitia et Martin. Cela a été l'occasion de partages multiples. Les succès, les échecs et les interactions ont été partagés. Une mention spéciale à Francis qui m'a permis de réapprendre à jouer au tennis (je crois savoir que c'était aussi un peu réciproque...). Je souhaite bon courage à Antoine et Martial pour la suite de leurs recherches.

Je remercie Agnès Delaunay, Natacha Le Moan et Ludivine Monceau (SBMS), Anne Chevalier, Joël Acker (SBGM) et Pascal Belin (DIEP), pour leur soutien technique dans la partie biochimique de ce travail.

Je voudrais enfin remercier chaleureusement mes parents sans qui rien ne serait arrivé ; Aurélie, Olivier, Thomas et Lou-Anne, qui ont été présents et m'ont supporté durant toutes ces années. Un merci tout particulier à ma mère et à ma sœur qui ont effectué une relecture attentive de ce manuscrit.

Enfin, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur, si au cours de celle-ci, je n'avais rencontré celle qui allait bientôt devenir ma femme. Reste telle quelle, Elise.

Cette dernière phrase est dédiée à Joël Martin, rencontré au cours de cette belle thèse, dans un coin du DAPNIA ; mi-chercheur mi-écrivain et rédacteur, entre autres, de la bible. C'est grand et long et c'est, je crois, la raison pour laquelle une thèse donne du bonus.



*A Eugénie, Alice et Auguste et Michel*

# **SOMMAIRE**

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>5</b>
<b>PRESENTATION DU SUJET .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE I : IMPORTANCE BIOLOGIQUE DES ORGANISMES</b>	
<b>PHOTOSYNTHÉTIQUES .....</b>	<b>13</b>
I.    CLASSIFICATION SYSTÉMATIQUE .....	13
II.   PRODUCTION DE L'ATMOSPHÈRE OXYGÉNIQUE.....	13
III.   LES CYANOBACTÉRIES.....	14
A. <i>Diversité morphologique et physiologique</i> .....	14
B. <i>Synechocystis, cyanobactérie modèle</i> .....	16
<b>CHAPITRE II : LE MÉTABOLISME RÉDOX DES ORGANISMES</b>	
<b>PHOTOSYNTHÉTIQUES .....</b>	<b>18</b>
I.    MÉTABOLISME RÉDOX ET TRANSFERT D'ÉLECTRONS.....	18
A. <i>Notion de potentiel d'oxydoréduction</i> .....	18
B. <i>Acteurs protéiques du métabolisme rédox</i> .....	19
1.   Protéines à co-facteur FAD ou FMN.....	19
2.   Protéines à centre Fe-S.....	20
3.   Protéines possédant des cystéines actives : formation de ponts disulfures.....	21
II.   LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DES ORGANISMES PHOTOSYNTHÉTIQUES.....	25
A. <i>La photosynthèse</i> .....	25
1.   Bilan énergétique.....	25
2.   Les phycobilisomes .....	27
3.   Les caroténoïdes .....	28
4.   Le photosystème II .....	28
5.   Le complexe cytochrome b6/f .....	29
6.   Le photosystème I .....	29
7.   L'ATP synthase.....	30
8.   Le transfert cyclique d'électrons .....	30
9.   Photoinhibition et dissipation d'énergie.....	30
10.  Photosynthèse et métabolisme général .....	32
11.  L'assimilation du carbone .....	32
B. <i>La respiration</i> .....	33
<b>CHAPITRE III : LES DEUX VOIES DE CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DES</b>	

## THIOLS.....34

I.	LE CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DES THIOLS CHEZ LES ORGANISMES MODÈLES NON- PHOTOSYNTHÉTIQUE.....	34
II.	LES ACTEURS DU CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DES THIOLS .....	35
III.	LES VOIES THIORÉDOXINE ET GLUTARÉDOXINE INTERAGISSENT.....	40
A.	<i>Le contrôle de l'homéostasie des thiols dans les mitochondries.....</i>	40
B.	<i>Diversité des systèmes de contrôle de l'homéostasie des thiols.....</i>	41
IV.	STRUCTURE, FONCTION DES GLUTARÉDOXINES .....	45
A.	<i>Les grandes familles de glutarédoxines .....</i>	45
B.	<i>Les glutarédoxines sont ubiquistes.....</i>	46
C.	<i>Glutarédoxines : enzymes et modules. ....</i>	48
D.	<i>Différentes onctions cellulaires des glutarédoxines.....</i>	49
1.	La fonction réductrice des glutarédoxines.....	49
2.	Grx et assemblage des centres Fe-S .....	50
3.	Glutarédoxines et catalyse de la déglutathionylation.....	51
4.	Expression des glutarédoxines et résistance au stress oxydant.....	54

## CHAPITRE IV : LE CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DES THIOLS CHEZ LES ORGANISMES PHOTOSYNTHÉTIQUES.....55

I.	LE SYSTÈME DE CONTRÔLE CHLOROPLASTIQUE DE L'HOMÉOSTASIE DES THIOLS .....	55
II.	LE MÉTABOLISME RÉDOX DE <i>SYNECHOCYSTIS</i> .....	57

## CHAPITRE V: LE STRESS RÉDOX, PERTURBATION DU MÉTABOLISME RÉDOX.....59

I.	LA FORMATION D'ERO .....	59
A.	<i>Définition.....</i>	59
B.	<i>Excès des ERO et stress rédox.....</i>	60
II.	AGENTS OXYDANTS ET MÉTAUX PRODUISENT DES ERO.....	64
A.	<i>Agents oxydants et stress oxydant .....</i>	64
B.	<i>Métaux et stress métalliques.....</i>	65
1.	Mécanismes généraux .....	65
2.	Toxicité propre des métaux : l'exemple du sélénium .....	66
III.	LES EFFECTEURS DE LA RÉPONSE AU STRESS RÉDOX.....	68
A.	<i>Prise en charge du stress oxydant.....</i>	68
B.	<i>Prise en charge du stress métallique.....</i>	70
1.	La réductase de l'arsenate (ArsC).....	70
2.	La réductase du mercure .....	72
3.	La définition des réductases métaux.....	75

## RESULTATS .....77

### CHAPITRE I : MISE EN ÉVIDENCE DE LA SÉLECTIVITÉ DES

## GLUTARÉDOXINES DE *SYNECHOCYSTIS*.....77

I.	LA SÉQUENCE DU GÉNOME DE <i>SYNECHOCYSTIS</i> PRÉDIT L'EXISTENCE DE TROIS GLUTARÉDOXINES.....	77
II.	LES GLUTARÉDOXINES SONT IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE AU STRESS OXYDANT.....	83
A.	<i>Construction des mutants dépourvus de glutarédoxines</i> .....	83
B.	<i>Contenu pigmentaire des mutants</i> .....	87
C.	<i>Rôle des glutarédoxines dans la tolérance aux stress</i> .....	90
III.	IDENTIFICATION DE NOUVEAUX PARTENAIRES DES GLUTARÉDOXINES .....	93
A.	<i>Description du système de test double hybride bactérien</i> .....	93
B.	<i>Interactions identifiées</i> .....	95

## CHAPITRE II : CARACTÉRISATION DE NOUVELLES VOIES RÉDOX DE RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DES RÉDUCTASES MÉTAUX.....97

I.	ARSC DE <i>SYNECHOCYSTIS</i> INTERAGIT AVEC GRX2 ET GRX3.....	97
II.	MISE EN ÉVIDENCE ET ANALYSE DE L'INTERACTION GRX1-MER A .....	98
A.	<i>Analyse de l'interaction Grx1-MerA par mutagenèse dirigée</i> .....	98
B.	<i>Validation de l'interaction Grx1-MerA par GST Pulldown</i> .....	102
C.	<i>Régulation de l'activité de MerA par glutathionylation/déglutathionylation</i> .....	104
D.	<i>Implication de Grx1 et MerA en réponse aux stress métalliques</i> .....	109
1.	Les mutants $\Delta grx1$ et $\Delta merA$ sont sensibles au mercure et à l'uranium.....	109
2.	La cystéine 78 de MerA et la cystéine 86 de Grx1 sont importantes pour les fonctions de chaque protéine <i>in vivo</i> .....	110
III.	ARSC INTERVIENT DANS LA TOLÉRANCE AU CADMIUM.....	111

## CHAPITRE III : IDENTIFICATION ET ANALYSE D'UNE NOUVELLE VOIE RÉDOX TR-GRX1-GRX2 IMPLIQUÉE DANS LA DÉTOXIFICATION DU SÉLÉNATE ..... 113

I.	GRX1 INTERAGIT AVEC LA THIORÉDOXINE RÉDUCTASE (TR) ET AVEC GRX2 .....	113
II.	RÔLE DES CYSTÉINES DE GRX1, GRX2 ET TR .....	114
A.	<i>Analyse de l'interaction Grx1 – TR par mutagenèse dirigée</i> .....	114
B.	<i>Analyse de l'interaction Grx2 - Grx1 par mutagenèse dirigée</i> .....	117
III.	VALIDATION <i>IN VITRO</i> DES INTERACTIONS TR-GRX1-GRX2, IMPLICATION DANS LA DÉTOXIFICATION DU SÉLÉNATE.....	118
A.	<i>Construction et purification des protéines TR, Grx1 et Grx2 fusionnées à une étiquette 6xHis</i> ....	118
B.	<i>Mise en évidence de la cascade d'oxydoréduction TR-Grx1-Grx2</i> .....	120
IV.	RÉGULATION <i>IN VIVO</i> DE GRX1 ET GRX2 EN RÉPONSE AU SÉLÉNATE .....	124
A.	<i>Constructions des fusions myc-Grx1 et Grx2-myc</i> .....	124
B.	<i>Formation d'un hétérodimère Grx1-Grx2 in vivo</i> .....	125
V.	LA THIORÉDOXINE RÉDUCTASE A UN RÔLE CLEF CHEZ <i>SYNECHOCYSTIS</i> .....	128
A.	<i>Absence de <math>\Delta</math>glutamylcystéine synthetase (GshA)</i> .....	128
B.	<i>Absence de réductase du glutathion (GR) chez Synechocystis</i> .....	129

C.	<i>TR est essentielle à la viabilité cellulaire de Synechocystis</i> .....	130
----	----------------------------------------------------------------------------	-----

## CONCLUSION, PERSPECTIVES..... 132

## MATERIEL ET METHODES..... 139

I.	MATÉRIELS .....	139
A.	<i>Synechocystis PCC6803</i> .....	139
B.	<i>Souches E. coli</i> .....	140
II.	MÉTHODES.....	141
A.	<i>Biologie moléculaire</i> .....	141
1.	Resuspension et dosage des acides nucléiques .....	141
2.	Extraction et purification d'acides nucléiques .....	141
3.	Amplification d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) .....	141
4.	Purification d'un fragment ADN par électrophorèse préparative .....	142
5.	Ligation - Transformation par choc thermique chez <i>E. coli</i> .....	144
6.	Mutagenèse dirigée .....	144
7.	Construction des cassettes d'inactivation .....	145
8.	Construction des fusions myc-Grx1 et Grx2-myc .....	146
9.	Réactions de séquence.....	146
B.	<i>Conjugaison de plasmide chez Synechocystis</i> .....	146
C.	<i>Transformation et inactivation de gène chez Synechocystis</i> .....	149
D.	<i>Double-hybride E.coli</i> .....	150
1.	Test double-hybride.....	150
2.	Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase .....	151
3.	Dosage de protéines .....	153
E.	<i>Méthodes d'analyse biochimiques</i> .....	153
1.	Surproduction de protéines de fusion .....	153
2.	Purification des protéines de fusion (-His ou -GST) .....	154
3.	Réduction et Glutathionylation <i>in vitro</i> des protéines purifiées.....	155
4.	La technique du GST Pulldown.....	155
5.	Dosage d'activités enzymatiques <i>in vitro</i> .....	157
F.	<i>Analyse in vivo</i> .....	159
1.	Test de tolérance aux métaux lourds et aux agents oxydants.....	159
2.	Analyse globale des pigments de <i>Synechocystis</i> .....	160
3.	Etude de l'état rédox des glutarédoxines <i>in vivo</i> .....	161

## ARTICLE I..... 165

## BIBLIOGRAPHIE ..... 206

## **PRESENTATION DU SUJET**

L'utilisation du pouvoir réducteur du NADPH pour maintenir l'homéostasie rédox des thiols est un processus vital pour la cellule faisant intervenir deux voies supposées distinctes : 1) thiorédoxine réductase/thiorédoxine et 2) glutathion réductase/glutathion/glutarédoxine, bien caractérisées chez les organismes hétérotrophes modèles *E. coli* et *S. cerevisiae*. Curieusement, ces voies sont mal connues chez les organismes photosynthétiques dont le métabolisme rédox, dépendant de la photosynthèse, est essentiel à la biosphère (renouvellement de l'atmosphère oxygénique, assimilation du carbone et de l'azote atmosphérique nécessaires à la production de biomasse pour la chaîne alimentaire). C'est pourquoi le laboratoire a entrepris l'analyse de ces voies rédox, en utilisant un organisme modèle adapté aux approches de génomique fonctionnelle : la cyanobactérie *Synechocystis*.

Au cours de ma thèse, j'ai analysé *in vivo* et *in vitro* deux des trois glutarédoxines (Grx) de *Synechocystis*, et montré que Grx1 interagit directement avec Grx2 d'une part, et avec la réductase du mercure MerA d'autre part. Ces résultats sont totalement novateurs ; ils n'ont jamais été décrits dans la littérature. Les deux voies rédox ainsi caractérisées : 1) Thiorédoxine réductase-Grx1-Grx2-réduction du sélénate et 2) Grx1-MerA-réduction du mercure sont particulièrement intéressantes car elles permettent de relier deux processus rédox, homéostasie des thiols et détoxification des métaux lourds par réduction, qui ne sont pas considérés comme étant étroitement imbriqués.

## **RESUME**

Le maintien de l'homéostasie rédox des thiols, dépendant du pouvoir réducteur du NADPH, est un processus vital pour la cellule faisant intervenir deux voies supposées distinctes : 1) thiorédoxine réductase/thiorédoxines et 2) glutathion réductase/glutathion/glutarédoxines. En dépit de leur importance, on connaît mal la spécificité des glutarédoxines et des thiorédoxines [1]. C'est particulièrement vrai chez les organismes photosynthétiques, dont le métabolisme rédox, dépendant de la photosynthèse, est essentiel à la biosphère (production d'oxygène, assimilation du carbone et de l'azote inorganiques nécessaires à la production de biomasse pour la chaîne alimentaire). La photosynthèse, comme la respiration, produit des molécules oxydantes (les espèces activées de l'oxygène) qui perturbent, entre autres, l'homéostasie rédox des thiols.

Dans le cas des glutarédoxines, il a été montré, chez les organismes hétérotrophes, que ces enzymes utilisent le pouvoir réducteur du glutathion (re-réduit par le NADPH via la glutathion réductase) pour contrôler l'état rédox des thiols des résidus cystéines (Cys) des protéines (réduire les ponts disulfure inter- ou intra-moléculaires). Les glutarédoxines se répartissent en deux grandes familles, selon la composition de leur centre rédox actif : les glutarédoxines à dithiol (possédant un site actif de type CysXXCys) et les glutarédoxines à monothiol (avec un site actif de type CysXXSer).

Au cours de ma thèse, j'ai analysé, *in vitro* et *in vivo*, les glutarédoxines avec un organisme photosynthétique modèle: la cyanobactérie unicellulaire *Synechocystis* PCC6803 (*Synechocystis*), qui possède un petit génome (3,57 Mb) entièrement séquencé et génétiquement manipulable avec les vecteurs plasmidiques développés au laboratoire. *Synechocystis* possède 3 glutarédoxines (Grx): deux à dithiol (Grx1 et Grx2) et une à monothiol (Grx3). Dans un premier temps, j'ai inactivé les 3 gènes correspondants, indépendamment ou non. Tous les mutants correspondants (simples, doubles et triple) sont parfaitement viables, dans les conditions standard de croissance. Par contre, leur tolérance aux stress diffère de celle de la souche sauvage. Le mutant  $\Delta grx1$  est sensible au mercure ( $HgCl_2$ ) et à l'uranium ( $(CH_3COO)_2UO_2$ ). Le mutant  $\Delta grx2$  est sensible au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), au cadmium ( $CdSO_4$ ) et au sélénate ( $NaSeO_4$ ). Le mutant  $\Delta grx3$  est sensible au bleu de méthylène. Le triple mutant  $\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$  est sensible à chacun des toxiques précédemment cités, et aussi, de façon spécifique par rapport aux autres mutants, à un excès (x25) de zinc ( $ZnCl_2$ ). Ces résultats indiquent que les Grx possèdent une certaine sélectivité, qui s'exerce vraisemblablement au travers d'interactions spécifiques.

Pour rechercher des partenaires protéiques des Grx, j'ai utilisé un système bactérien de "double hybride", basé sur 2 plasmides dans lesquels on peut cloner, indépendamment, les gènes codant pour les protéines "appâts" (chacun des trois gènes *grx*) et les protéines "proies" (les partenaires possibles des Grxs). Pour identifier ces dernières, nous avons cloné, indépendamment, une cinquantaine des gènes impliqués dans métabolisme rédox, sans se limiter au contrôle de l'homéostasie rédox des thiols. Les 1000 tests d'interaction réalisés nous ont permis d'identifier 10 interactions totalement nouvelles impliquant des Grx. Ensuite, j'ai analysé les interactions (1) Grx1-MerA (MerA est la réductase du mercure) et (2) thiorédoxine réductase-Grx1-Grx2, par une approche multidisciplinaire: (i) mutagenèses dirigées, tests double hybride et études *in vivo*; (ii) approche biochimique (GST Pulldown); et (iii) tests d'activité *in vitro*.

J'ai montré que l'activité de réduction du mercure de MerA est inhibée, de façon réversible, par la glutathionylation (fixation d'une molécule de glutathion) d'une cystéine (Cys78) de son site actif. Grx1 réactive MerA en catalysant la réaction de déglutathionylation du site actif de MerA. Outre la tolérance de *Synechocystis* au mercure ( $\text{HgCl}_2$ ), j'ai montré que Grx1 et MerA interviennent également dans la résistance à l'uranium  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{UO}_2$ .

Parallèlement, j'ai analysé les interactions thiorédoxine réductase-Grx1-Grx2. J'ai montré que la thiorédoxine réductase est capable de réduire Grx1, qui peut à son tour réduire Grx2. Cette voie rédox originale compense l'absence de glutathion réductase chez *Synechocystis*. J'ai également montré que cette "nouvelle" voie rédox est capable de réduire le sélénate. Ces résultats *in vitro* sont confortés par certains de mes résultats qui suggèrent que *Synechocystis* répond au sélénate par la formation d'un hétérodimère Grx1-Grx2.

Les deux "nouvelles" voies rédox caractérisées au cours de ma thèse sont particulièrement intéressantes car elles permettent de relier deux processus rédox, homéostasie rédox des thiols et détoxification des métaux lourds par réduction, qui n'étaient jusqu'ici pas considérés comme étant étroitement imbriqués.





# **INTRODUCTION**

## **Chapitre I : Importance biologique des organismes photosynthétiques**

### **I. Classification systématique**

Le règne végétal est séparé en deux grandes divisions : les procaryotes et les eucaryotes.

Les procaryotes sont des organismes unicellulaires dont le matériel génétique n'est pas protégé par une membrane (par opposition aux eucaryotes, qui présentent un véritable noyau). Les procaryotes photosynthétiques sont essentiellement représentés par les cyanobactéries. Ils ont été parmi les premiers êtres vivants à apparaître sur terre (–3,5 milliards d'années) [2]. Ils ont participé à la formation d'une atmosphère oxygénique terrestre.

### **II. Production de l'atmosphère oxygénique**

Dans l'état actuel des connaissances, on pense que l'Univers s'est formé il y a environ 15 milliards d'années, et la Terre il y a 4,6 milliards d'années. Après la stabilisation de la température, qui a permis l'accumulation d'eau liquide à la surface du globe, les conditions de l'apparition de la «vie» ont été réunies. Les premiers organismes photosynthétiques, des cyanobactéries marines, ont rapidement proliféré et ont progressivement modifié la composition de l'atmosphère. Des traces fossiles de stromatolithes datant de 3,5 milliards d'années ont été découvertes, notamment en Afrique du Sud et en Australie [3] [4]. Ces sédiments, vraisemblablement issus de l'activité de cyanobactéries, attestent de leur présence et de leur activité passée [2]. La production d'oxygène ( $O_2$ ) assurée par les cyanobactéries a permis son accumulation dans l'atmosphère [5]. Les premières plantes (organismes eucaryotes photosynthétiques supérieurs) sont apparues il y a 2 milliards d'années et transformèrent une grande partie du gaz carbonique en oxygène (par le processus de la photosynthèse, voir Chapitre II, partie I). Ce processus se poursuit toujours et l'atmosphère actuelle contient environ 21 % d'oxygène (sous forme de dioxygène).

Les cyanobactéries demeurent, de nos jours, les organismes photosynthétiques les plus abondants de notre environnement. Elles assurent environ 30 à 40 % de la production d' $O_2$ , de

la consommation de CO<sub>2</sub> (gaz à effet de serre) par les océans [6] et de la fixation du N<sub>2</sub>, tout en produisant la biomasse nécessaire au développement de la chaîne alimentaire (phytoplancton). Se situant à sa base, les cyanobactéries sont également la première barrière à l'entrée des toxiques (dont les métaux lourds) dans la chaîne alimentaire.

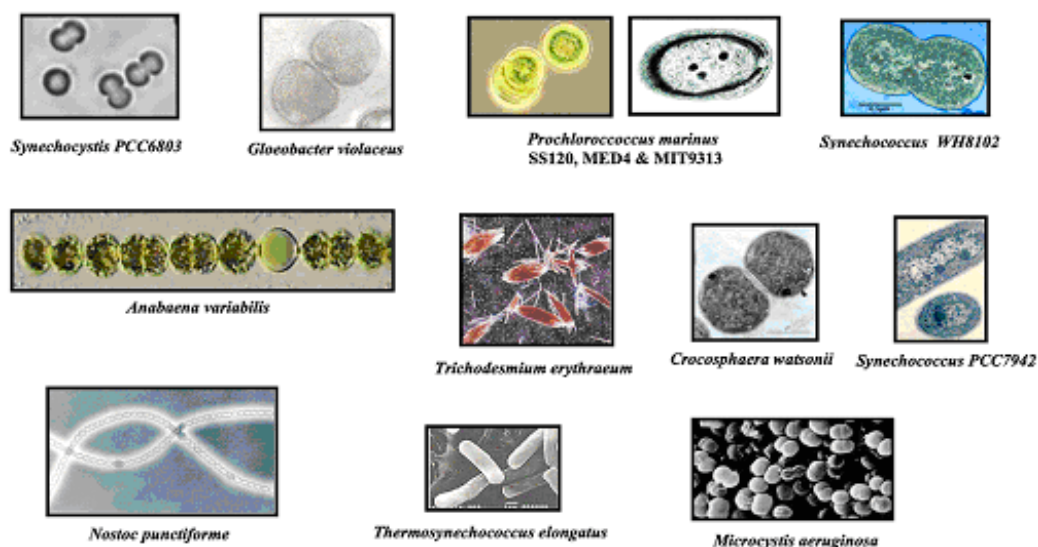
### III. Les cyanobactéries

#### A. Diversité morphologique et physiologique

Il existe plus de 2000 espèces de cyanobactéries réparties en 5 sections : les *Chroococcales* (ordre auquel appartient *Synechocystis* sp. PCC6803, que j'appellerai par la suite *Synechocystis*, que nous étudions au laboratoire), les *Pleurocapsales*, les *Chamaesiphonales*, les *Stigonématales* et les *Nostocales* [7].

Les cyanobactéries possèdent une grande faculté d'adaptation à leur environnement. Elles ont ainsi pu coloniser une très grande variété de biotopes. Elles sont présentes dans tous les plans d'eau de la planète, quelle que soit leur salinité. Certaines espèces peuvent vivre à des températures extrêmes allant de 4°C à 70°C, sur des glaciers comme sur des sols désertiques [8].

Il existe une grande diversité de cyanobactéries, à la fois sur le plan morphologique et métabolique. Elles peuvent être unicellulaires (ex : *Synechocystis* sp. PCC6803 et *Synechococcus* sp. PCC7942) ou pluricellulaires, organisées en filaments linéaires (ex : *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. PCC7120, *Spirulina* sp.) ou ramifiés (*Fischerella* sp.) [7] (Figure 1).



**Figure 1: Diversité morphologique des cyanobactéries.** Photographies en microscopie photonique ou électronique de plusieurs cyanobactéries dont le génome est séquencé (<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/>).

Certaines espèces sont capables de différencier des cellules spécialisées (hormogonies, hétérocystes, akinètes) en réponse aux changements de l'environnement (pour revue, voir [9]).

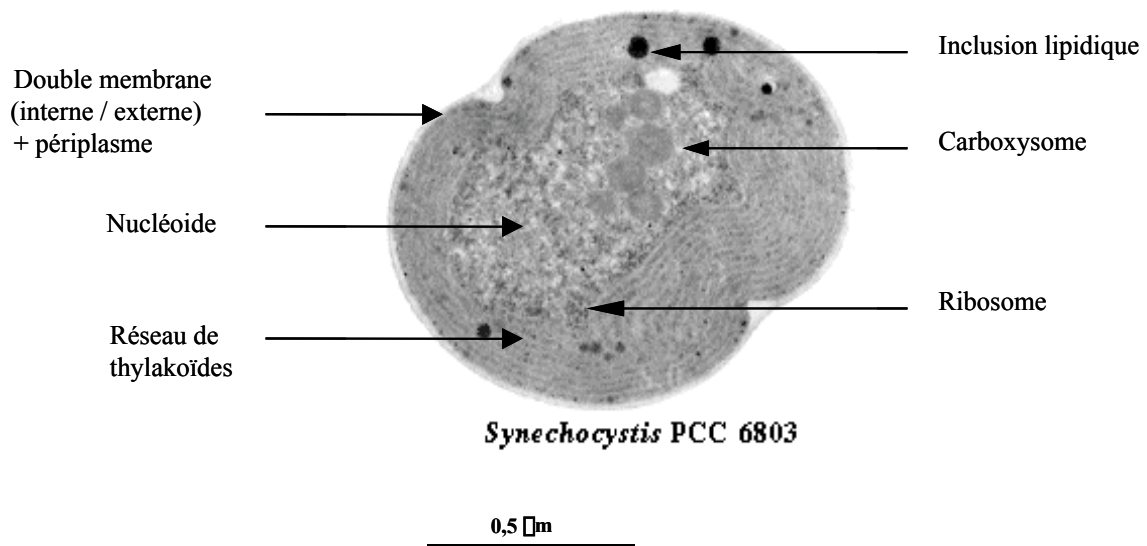
**Transport et assimilation de l'azote.** Les cyanobactéries sont capables d'incorporer différentes sources d'azote dont l'ammonium, le nitrate, le nitrite et l'urée. Certaines sont même capables de fixer l'azote atmosphérique (*Anabaena* PCC7120), ou d'assimiler des acides aminés comme l'arginine ou la glutamine [10], [11].

*Synechocystis* possède également la particularité d'être hétérotrophe facultative [7], et peut donc pousser en absence d'activité photosynthétique dans un milieu enrichi en glucose. Ceci a permis de caractériser les composants de l'appareil photosynthétique par l'analyse de mutants non essentiels sur un milieu enrichi en glucose [12] [13].

## B. *Synechocystis*, cyanobactérie modèle

Historiquement, *Synechocystis*, a été un modèle cyanobactérien d'analyse de la photosynthèse [14], [15], [16].

*Synechocystis* est une cyanobactérie unicellulaire euryhaline (vivant en milieux saumâtres). Ce micro-organisme ( $\varnothing$  1  $\mu$ m) ne possède pas d'organites telles que les chloroplastes ou les mitochondries, présents exclusivement au sein de cellules eucaryotes. Elle possède une double membrane et un périplasme. Cet organisme possède des thylakoïdes<sup>1</sup>, sièges de la photosynthèse, dans son cytoplasme (Figure 2). La respiration a lieu dans la membrane interne de la paroi cellulaire et dans les thylakoïdes. Si les acteurs de la respiration et de la photosynthèse sont localisés dans les membranes, les produits de ces voies métaboliques sont présents dans le cytoplasme (voir Chapitre II). L'ADN est aussi présent dans ce compartiment (absence de noyau).



**Figure 2 : *Synechocystis* est un organisme procaryote photosynthétique.** D'après Shinodou Okamoto (<http://cyano.genome.jp>). Coupe d'une cellule de *Synechocystis* observée en microscopie électronique.

<sup>1</sup> Saccule aplati présent dans le cytoplasme des cyanobactéries et entre les lamelles du chloroplaste des cellules végétales Eucaryotes. Ils contiennent les pigments (chlorophylle, carotène, quinone) et les protéines transporteurs d'électrons indispensables à la réalisation de la photosynthèse.

Toutes fonctions cellulaires confondues, *Synechocystis* partage de nombreux gènes avec les plantes (environ 600 gènes, dont 160 n'ont pas de fonction connue). Ces chiffres ont été établis en utilisant des critères d'alignement de séquence stringents (Programme BLASTP:  $E.value \leq 10^{-10}$ , Identité  $\geq 20\%$ , Similarité  $\geq 40\%$ ) [17].

Les conditions de culture sont facilement contrôlées et reproductibles car *Synechocystis* se développe sur milieu minéral, dont la composition exacte est connue, sans ajout de compléments. Ceci est particulièrement adapté à l'analyse de la réponse cellulaire à des xénobiotiques introduits dans le milieu de culture. En effet, leur interaction avec les macromolécules des milieux de cultures organiques peut modifier leur biodisponibilité ainsi que leur forme chimique.

Le premier génome cyanobactérien qui a été entièrement séquencé est celui de *Synechocystis* [18]. Il est accessible sur le site CYANOBASE (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>). La moitié des séquences codantes identifiées ne possède pas d'homologue ayant une fonction connue. L'analyse de la fonction des gènes de *Synechocystis* est une source importante de nouvelles annotations. Cependant, cette analyse montre que certaines séquences codantes possédant des homologies fortes avec des gènes ayant une fonction connue peuvent ne pas avoir la même fonction. Par exemple, au laboratoire, une nouvelle fonction a été associée au gène codant pour LexA, qui est bien un régulateur, mais pas du système SOS, comme cela avait été montré précédemment. Cette protéine intervient dans le métabolisme du carbone [19].

Son petit chromosome circulaire de 3,57 Mb est polyploïde [20], chaque cellule contient une dizaine de copies du chromosome en phase exponentielle de croissance (il semble que toutes les copies de gènes soient exprimées).

Enfin, cet organisme est particulièrement intéressant sur le plan génétique car naturellement transformable [21]. La recombinaison homologue, très efficace, permet de déléter aisément n'importe lequel de ses gènes [22].

La fonction et l'expression de l'ensemble des gènes de *Synechocystis* (y compris les gènes essentiels) et la localisation des protéines correspondantes peuvent être analysées *in vivo* grâce aux vecteurs et aux stratégies génétiques développées au laboratoire [23] [24] [25] [26, 27].

Les organismes photosynthétiques ont un métabolisme rédox particulier. En effet, ces organismes sont capables de réaliser la photosynthèse et la respiration. Celle-ci oriente largement le métabolisme rédox de ces organismes.

## **Chapitre II : Le métabolisme rédox des organismes photosynthétiques**

### **I. Métabolisme rédox et transfert d'électrons**

#### **A. Notion de potentiel d'oxydoréduction**

Le métabolisme rédox implique des cascades de transferts d'électrons entre les partenaires des différentes voies de signalisation cellulaire.

Les équations chimiques correspondant aux réactions d'oxydoréduction peuvent être décrites en utilisant les couples rédox, sous réserve de satisfaire à certaines conditions thermodynamiques.

Les acteurs protéiques participant à ces réactions existent sous deux formes : l'une réduite, l'autre oxydée. Le passage de la forme oxydée à la forme réduite nécessite le gain d'un ou plusieurs électrons. La force réductrice de chaque acteur rédox est caractérisée par un potentiel d'oxydoreduction ou potentiel rédox. La mesure de ce potentiel prend comme référence l'équilibre d'oxydoréduction de l'hydrogène :  $[H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-]$ . Le potentiel redox de cet équilibre est pris comme référence avec  $E^0_{H_2/H^+} = 0$  Volt. Les valeurs  $E^\circ$  négatives correspondent aux espèces réductrices ayant un excès d'électron et les valeurs  $E^\circ$  positives aux molécules oxydantes, demandeuses d'électrons. Une espèce chimique n'est capable de donner ses électrons à une autre seulement si son potentiel redox est inférieur à celui de son partenaire. Ainsi, plus une molécule possède un potentiel redox négatif, plus son pouvoir réducteur est important.

A titre d'illustration, le potentiel rédox du couple  $NADPH/NADP^+$  ( $NADP^+ + e^- + H^+ \rightleftharpoons NADPH$ ) est  $E^\circ = -315$  mV (à 25°C, pH=7). Comme nous le verrons par la suite, le NADPH est un des principaux réductants cellulaires.

Les propriétés rédox des acteurs protéiques leur sont conférées par des éléments structuraux particuliers qui peuvent être un site actif disulfure (CXXC), un centre fer-soufre (Fe-S) ou un site de liaison à un co-facteur (Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) ou Flavine Mononucleotide (FMN)) capable d'utiliser directement le pouvoir réducteur du NADPH ou encore la liaison de l'apoprotéine à des métaux (cuivre, manganèse, zinc, etc...)

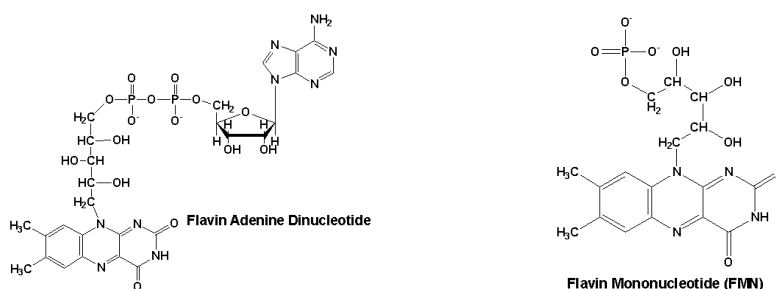
## B. Acteurs protéiques du métabolisme rédox

### 1. Protéines à co-facteur FAD ou FMN

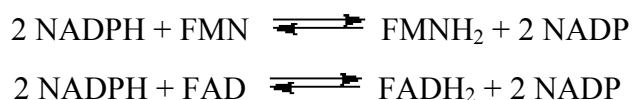
De manière générale, un coenzyme est une petite molécule organique indispensable au fonctionnement d'une enzyme. Un sous-groupe de cette famille comprend les coenzymes flaviniques (il faut noter que le NADPH, coenzyme nicotinique appartient aussi à cette famille, mais ne se lie pas directement auxdites protéines).

Ces coenzymes sont de couleur jaune (couleur de leur forme oxydée (absorbance à 250 et 420 nm), leur forme réduite est incolore). La vitamine B2 (appelée « riboflavine ») est à l'origine des coenzymes flaviniques FAD et FMN (voir leur formule développée en Figure 3). Les coenzymes flaviniques sont hydrosolubles. Ce sont des groupements prosthétiques liés à l'apoenzyme. Les équations de la Figure 3 montrent que ces deux co-enzymes transportent deux protons et deux électrons à chacune de leur réaction (deux molécules de NADPH sont nécessaires à leur réduction).

A.



B.



**Figure 3 : Structure des co-facteurs FAD et FMN (A.) et Réactions d'oxidoréduction des coenzymes FAD et FMN (B.)**

Des protéines telles que la réductase du mercure (ou mercuric réductase) (MerA) ou la thiorédoxine réductase (TR) (enzymes appartenant à la famille pyridine disulfide oxidoréductase) possèdent un site de liaison au FAD (voir respectivement Chapitre II.0 et Chapitre III.III.B).



## 2. Protéines à centre Fe-S

Un autre motif structural conférant des propriétés rédox est le centre Fer-Soufre [Fe-S].

De nombreuses protéines à centre Fer-Soufre [Fe-S] sont également capables de transférer des électrons. Elles possèdent un ou plusieurs groupements prosthétiques. Ces groupements sont composés d'atomes de Fer complexés par du soufre inorganique et maintenus par des résidus cystéines [28]. Il existe deux grands groupes de protéines à centre [Fe-S] :

- Les ferrédoxines et les rubrédoxines ne possèdent comme seul groupement prosthétique qu'un ou plusieurs centres [Fe-S] (groupement non-hémique). Actuellement, leur seule fonction connue est le transfert d'électrons [29].
- Les protéines qui possèdent, en plus de leur centre [Fe-S], d'autres groupements prosthétiques (Hèmes, flavines...) leur conférant une autre activité enzymatique. Par exemple, Ftr (ferrédoxine thiorédoxine réductase), enzyme présente dans les chloroplastes et le cytoplasme des cyanobactéries (voir Chapitre II.I), possède un centre [Fe-S] ainsi qu'un site actif disulfure (voir Chapitre II.I.B.3) ; Ces deux structures sont à l'origine des transferts intramoléculaires d'électrons [30].

Les ferrédoxines sont de petites protéines ubiquistes (6 à 25 kDa), présentes dans la plupart des organismes vivants (des bactéries (*Synechocystis*) à l'homme). Le nom de ferrédoxine a été donné pour la première fois à une protéine à fer non hémique intervenant dans la fixation de l'azote chez *Clostridium pasteurianum* [31]. Contrairement aux rubrédoxines, leur centre rédox est un ensemble de 2, 3 ou 4 atomes de fer et de soufre maintenus par le soufre des résidus cystéines de la chaîne peptidique (Figure 4) (pour revue voir [28]).

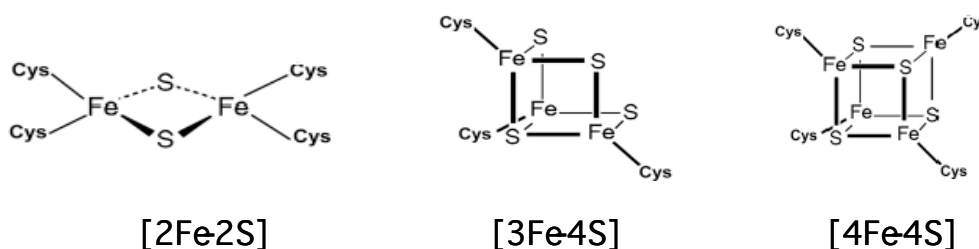


Figure 4 : Structure de divers centres [Fe-S]

Leur structure ainsi que leur propriété physicochimique de transfert d'électrons *in vitro* sont bien connues. En revanche, leur rôle biologique n'est pas élucidé. Il est en cours d'étude au laboratoire [24].

### **3. Protéines possédant des cystéines actives : formation de ponts disulfures**

Un dernier motif ayant des propriétés rédox est composé d'une ou de deux cystéines permettant la formation de ponts disulfures inter- ou intra- moléculaires.

**Différentes fonctions cellulaires sont associées à la formation de ponts disulfures.** Un pont disulfure correspond à la formation d'une liaison covalente entre deux cystéines situées à proximité dans l'espace. Cette liaison se forme plus précisément entre leurs groupements thiols (-SH) situés la plupart du temps à la surface des protéines. Sa formation est liée à la perte d'un électron. La formation ou la réduction des ponts disulfures sont des réactions réversibles.

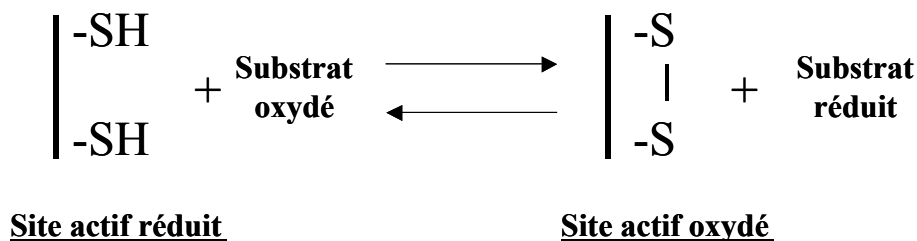
Trois types de fonctions sont associées à la formation des ponts disulfures. Ceux-ci peuvent être intramoléculaires et jouer un rôle structural, intermoléculaires et dans ce cas intervenir dans l'activité enzymatique (entre deux protéines) ou un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique (entre une protéine et une molécule de glutathion (GSH)).

#### **- Pont disulfure et structure protéique**

Chez certaines enzymes les ponts disulfures intramoléculaires sont des modifications post-transcriptionnelles conférant une structure tridimensionnelle stabilisée et fonctionnelle. Ainsi, l'exemple de l'insuline active met en évidence la présence de deux chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures [32]. Dans ce cas de figure, les cystéines impliquées dans le pont disulfure peuvent être très éloignées dans la structure primaire. Si l'activité de l'enzyme est conditionnée par sa structure et donc par la formation d'un pont disulfure structural, celle-ci n'est pas directement liée à l'activité de l'enzyme (localisée en dehors du site actif). Nous ne nous intéresserons pas à ce type de ponts disulfures dans la suite de cette étude.

#### **- Pont disulfure et activité enzymatique**

Un pont disulfure intramoléculaire peut se former entre les deux cystéines du site actif d'une protéine. Dans ce cas, c'est l'activité oxydoréductrice de l'enzyme qui est à l'origine de la perte d'un électron, à l'origine de la formation du pont disulfure.



**Figure 5 : Formation d'un pont disulfure intramoléculaire liée à l'activité enzymatique.** Les deux cystéines de la protéine sont représentées sous leur forme réduite (-SH) et sous leur forme oxydée, reliées par un pont disulfure (-S-S-).

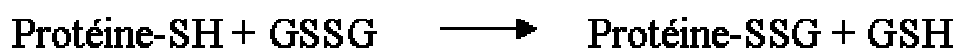
Ces ponts peuvent se former et disparaître sans modifier de façon drastique la structure tridimensionnelle de l'enzyme (proximité des cystéines dans la structure tridimensionnelle).

L'enzyme oxydée n'est plus active. Son activité est restaurée par la réduction et donc la disparition du pont disulfure formé au niveau du site actif.

- Pont disulfure et S-glutathionylation (ou glutathionylation)

Comme nous venons de le voir l'activité des enzymes possédant un site actif disulfure est liée à l'état d'oxydoreduction de ses cystéines

La glutathionylation est une modification post-traductionnelle au cours de laquelle la cystéine d'une molécule de glutathion (GSH) se lie au groupement -SH d'un résidu cystéine d'une protéine via un pont disulfure après réaction avec la forme oxydée du glutathion (GSSG) (description du glutathion, Chapitre III partie II)). Il se forme alors des formes mixtes disulfures. Seules les protéines possédant des cystéines et donc des résidus -SH réactifs ont la propriété de pouvoir être glutathionylées.



**Figure 6 : Mécanisme de glutathionylation (ou thiolation).** La cystéine réactive est représentée par le groupement thiol (-SH). GSSG : Glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit.

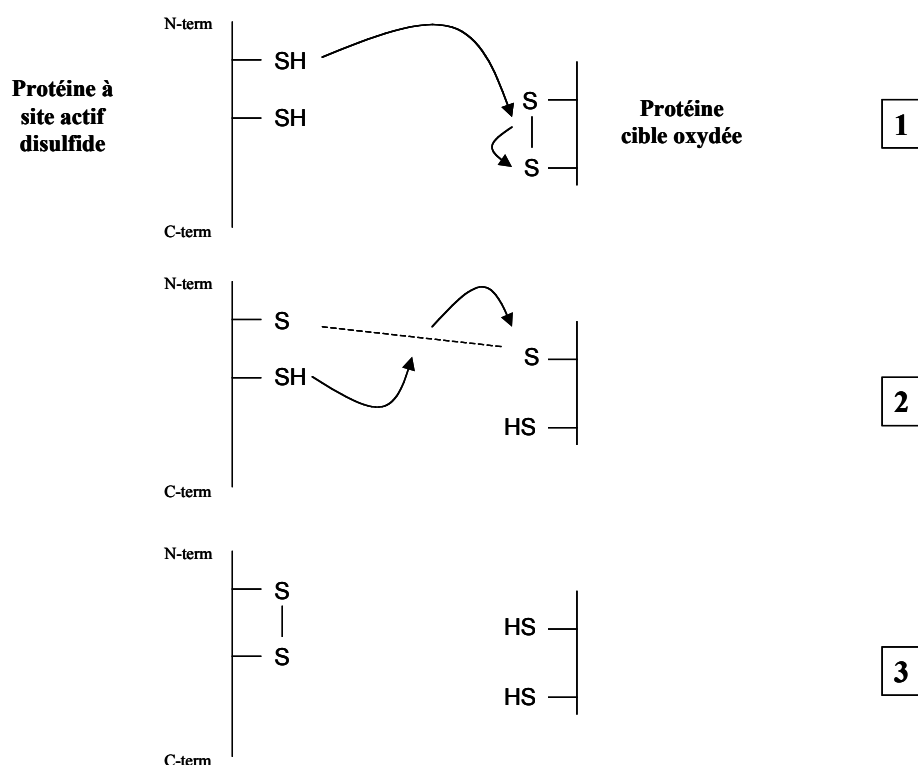
Cette fixation est réversible. D'un point de vue réactionnel, la fixation d'une molécule de

glutathion sur une cystéine peut également être interprétée comme un blocage transitoire de sa réactivité, mais elle peut aussi être considérée comme une protection de toute autre oxydation (réversible ou irréversible) due par exemple au stress oxydant (voir chapitre V partie I.B).

Par exemple, la PAPS réductase d'*E. coli* a la propriété d'être glutathionylée [33], cette réaction bloque l'activité rédox des cystéines de son site actif. Les réactions de glutathionylation/déglutathionylation et leurs conséquences sur l'activité des protéines seront abordées dans le Chapitre III.IV.D.3.

**Activité rédox et formation de ponts disulfures.** Les protéines principales des systèmes de contrôle du métabolisme rédox (thiorédoxines, glutarédoxines, ...) possèdent des sites actifs de la forme CXXC. Le nombre d'acides aminés présents entre les deux cystéines peut être supérieur mais la proximité de deux cystéines facilite la formation d'un pont disulfure intramoléculaire.

La caractérisation de ces sites actifs a montré que la cystéine N-terminale possède un faible pKa et sert à l'attaque nucléophile [34]. L'attaque par cette cystéine (Figure 7, étape 1) de la cystéine oxydée du substrat entraîne la formation d'un pont disulfure intermoléculaire transitoire (Figure 7, étape 2). L'attaque suivante implique la cystéine C-terminale du site actif CXXC et cible le pont disulfure intermoléculaire [35] [36] (Figure 7, étape 3). Il en résulte la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les deux cystéines du site actif CXXC et la libération de la cystéine réduite du substrat.



**Figure 7 : Réduction d'une protéine cible par une protéine à site actif disulfure.** 1) Réaction entre la cystéine N-terminale du site actif CXXC et le pont disulfure de la protéine oxydée, 2) Formation d'un pont disulfure intermoléculaire transitoire, 3) Formation d'un pont disulfure intramoléculaire au sein du site actif disulfure, réduction de la protéine cible.

Le mécanisme décrit ci-dessus n'est qu'un modèle d'étude. Il existe des protéines aux propriétés rédox possédant un site actif dont la cystéine C-terminale est substituée par une sérine (CXXS). Ces protéines conservent des propriétés d'oxydoréduction [37]. Chez d'autres protéines, possédant des homologues très fortes avec des protéines à site actif disulfure, la cystéine N-terminale est substituée par d'autres résidus (sérine ou thréonine). Leur fonction et celle de leur site actif ne sont toutefois pas connues [38].

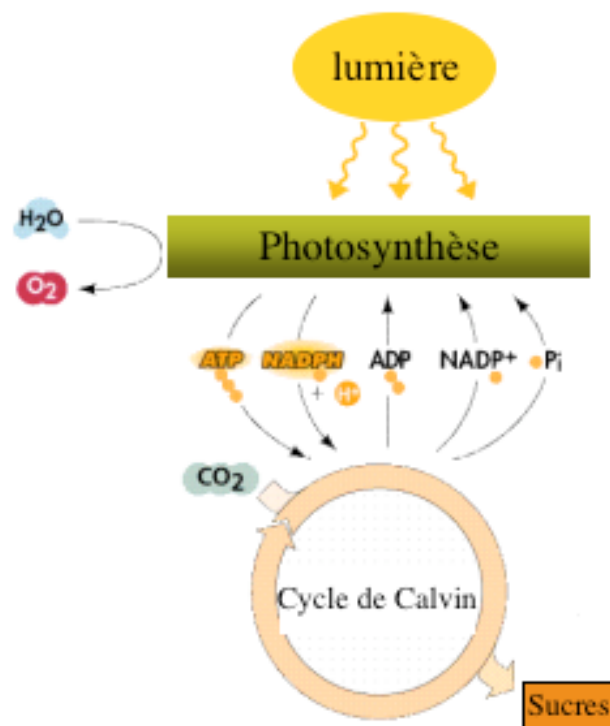
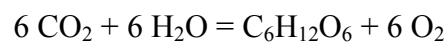
## II. Le métabolisme énergétique des organismes photosynthétiques

### A. La photosynthèse

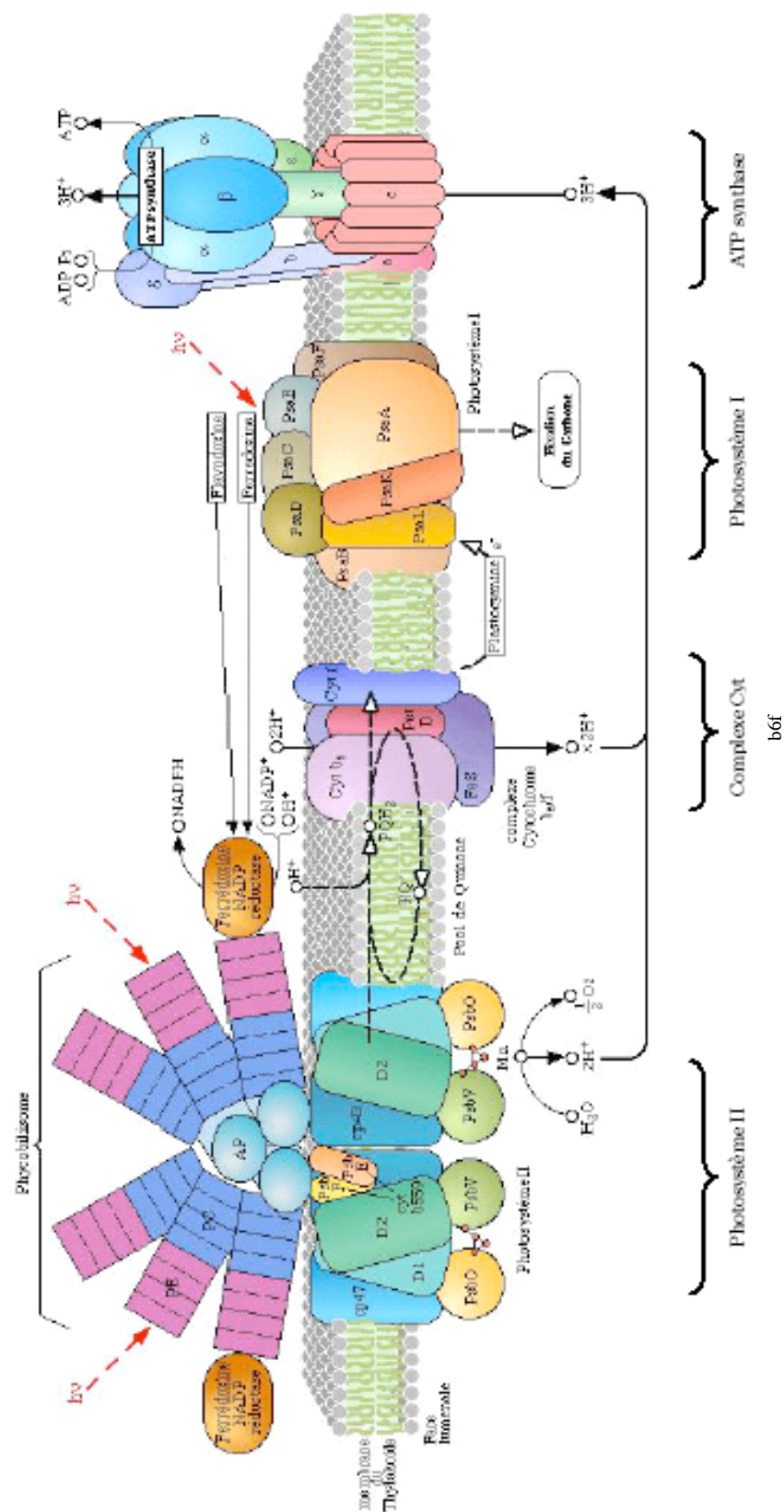
#### 1. Bilan énergétique

L'appareil photosynthétique des cyanobactéries est semblable à celui des plantes, et se compose de deux photosystèmes fonctionnant en série.

Au cours de ce processus photosynthétique, les électrons de l'eau sont capturés et utilisés, après excitation par la lumière, pour la réduction du NADPH et la synthèse d'ATP. Le NADPH est ensuite utilisé pour former des molécules organiques à partir du CO<sub>2</sub> fixé par le cycle de Calvin (Figure 8). L'équation bilan de la fixation du carbone et de la synthèse de sucres est la suivante:



**Figure 8 : La photosynthèse fournit l'ATP et le NADPH indispensables à la production de matière organique.**



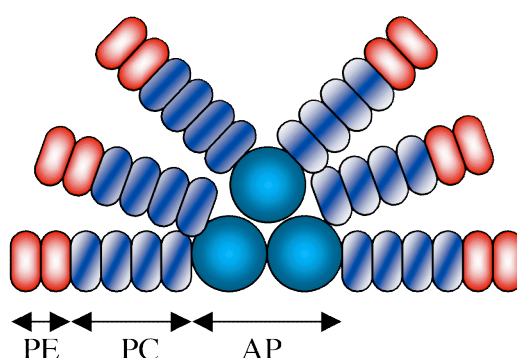
**Figure 9 : Structure et fonctionnement de l'appareil photosynthétique de *Synechocystis* (d'après [39]) [40] [41].**

Les premières étapes de la photosynthèse sont dépendantes de la lumière et constituent la phase lumineuse. Elles se déroulent au niveau des thylakoïdes et consistent en une chaîne de transfert d'électrons depuis l'eau jusqu'aux accepteurs finaux solubles comme la ferrédoxine, en utilisant l'énergie lumineuse captée au niveau des antennes photosynthétiques (phycobilisomes et/ou chlorophylles) (Figure 9).

## 2. Les phycobilisomes

Les cyanobactéries utilisent des phycobilisomes comme antennes collectrices de photons (Figure 10). L'énergie collectée est ensuite transférée jusqu'aux centres photochimiques ou photosystèmes, où elle est piégée par une paire spéciale de chlorophylle *a*.

Les phycobilisomes sont des structures situées sur la face cytoplasmique des membranes thylakoïdiennes et sont constituées à 80% de phycobiliprotéines. Ces dernières correspondent à une association de différents pigments, dont les plus largement répandus sont la phycocyanine (PC, 620nm) et l'allophycocyanine (AP, 650nm). Certaines espèces possèdent en plus de la phycoérythrine (PE, 565-575nm). L'association de ces différents pigments permet aux cyanobactéries d'absorber l'énergie lumineuse sur une large gamme de longueur d'ondes.



**Figure 10 : Représentation schématique d'un phycobilisome.** D'après [39] PE : phycoérythrine (absente chez *Synechocystis*), PC : phycocyanine, AP : allophycocyanine

Les phycobiliprotéines représentent près de la moitié des protéines solubles de la cellule, constituant une large réserve d'azote et de carbone qu'elles peuvent notamment utiliser



(dégradation) en cas de stress tels qu'une carence en azote ou en carbone (voir [9], [42])

### 3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments présents chez les plantes et les cyanobactéries. Ils contribuent à la fois à la capture de l'énergie lumineuse et à la protection de l'appareil photosynthétique contre le stress (pour revue [43]). En effet, les caroténoïdes capturent l'énergie lumineuse dans le spectre visible (300-450 nm), là où la chlorophylle est peu efficace. Ils piègent ("quenching") les chlorophylles dans l'état d'excitation triplet, et empêchent ainsi la formation d'oxygène singulet [44].

### 4. Le photosystème II

Le photosystème II (PSII ou P680) est le complexe responsable de l'oxydation de l'eau en  $O_2$ . Il est conservé chez tous les organismes réalisant la photosynthèse oxygénique : cyanobactéries, algues, et plantes [41].

Ce large complexe inséré dans la membrane des thylakoïdes (Figure 9) [45], [46] s'articule autour des protéines de haut poids moléculaire D1, D2, b559, CP43 et CP47, auxquelles s'ajoutent au moins 18 sous-unités de faible poids moléculaire. Leur rôle n'est pas toujours bien défini (pour revue [47]).

Le PSII est capable de capter l'énergie lumineuse grâce à une paire de chlorophylle *a* (Chl<sub>a</sub>) jouant le rôle de donneur primaire d'électrons [48]. Par ailleurs, une quarantaine de molécules de Chl<sub>a</sub> sont également fixées au niveau des protéines CP47 et CP43. Le PSII contient aussi des caroténoïdes dont la fonction est de protéger les molécules de chlorophylles contre la photo-oxydation [44], [49].

L'oxydation de l'eau en  $O_2$  nécessite la présence d'ions  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  et 4 ions  $Mn^{2+}$ . Cette oxydation a lieu sur la face lumenale des thylakoïdes [50].

Le flux de photons capté permet la réduction du pool de plastoquinone qui sera libéré dans la bicouche lipidique pour transmettre son pouvoir réducteur au complexe cytochrome b6/f.

## 5. Le complexe cytochrome b6/f

Le complexe intramembranaire cytochrome b6/f est une structure riche en fer (3 hèmes, un centre [Fe-S]) responsable du couplage entre les photosystèmes I et II. Il prend en charge les électrons venant du PSII par une série de réactions d'oxydo-reduction faisant intervenir la plastoquinone (PQ) et un accepteur final soluble : la plastocyanine (protéine à cuivre).

Chez les cyanobactéries, le cytochrome b6/f est capable d'interagir avec d'autres partenaires en fonction des conditions environnementales. Par ailleurs, le complexe b6/f intervient à la fois dans la photosynthèse et la respiration. Il est donc indispensable à la croissance en photoautotrophie et en hétérotrophie [51], [52]. Il intervient également dans le flux cyclique d'électrons autour du PSI.

## 6. Le photosystème I

Le photosystème I (PSI ou P700) est un complexe protéique implanté dans la membrane thylakoïdienne, responsable du transfert d'électrons entre la plastocyanine et les ferrédoxines (Figure 9). Le PSI comprend 11 polypeptides et un dimère de chlorophylle *a* photoactivable absorbant à 700 nm. Il possède également des bêta-carotènes et des antennes photosynthétiques (environ 110 molécules de chlorophylle *a*) qui complètent la fonction collectrice de lumière des phycobilisomes. Ces antennes sont liées au photosystème I par les protéines PsaA et PsaB [40].

Chez les cyanobactéries, le PSI se caractérise par la diversité de ses partenaires. Par exemple, le PSI peut recevoir ses électrons de la plastocyanine ou du cytochrome c-553 (carence en cuivre) et les transfère à la ferrédoxine ou bien à la flavodoxine (carence en fer). Le cytochrome c-553 (protéine à fer) est capable de remplacer la plastocyanine lors d'une carence en cuivre [53].

## 7. L'ATP synthase

L'ATP synthase utilise le gradient de protons établi par la photosynthèse, essentiellement au niveau de cytochrome b6/f et du PSII, pour produire de l'ATP. C'est un complexe protéique transmembranaire (CF<sub>0</sub>) qui permet la translocation des protons du stroma vers le cytoplasme. Puis, le complexe CF<sub>1</sub> ancré sur la face cytoplasmique de CF<sub>0</sub>, permet la catalyse de l'ADP en ATP [54].

## 8. Le transfert cyclique d'électrons

En l'absence d'accepteur d'électrons (ferrédoxine ou flavodoxine), un flux cyclique peut s'établir entre le PSI, le cytochrome b6/f et la réserve de plastoquinone et génère une accumulation de protons du côté lumenal du thylakoïde. La force motrice résultante va permettre la production d'ATP, indépendamment du clivage de l'eau. Elle ne permet néanmoins pas la réduction du NADPH. C'est phosphorylation cyclique.

Chez *A. thaliana*, le flux cyclique d'électrons est indispensable au fonctionnement optimal de la photosynthèse en participant au maintien du rapport ATP/NADPH [55]. Par ailleurs, chez *Synechocystis*, la protéine FQR (ferrédoxine:plastoquinone réductase) participant au flux d'électrons cyclique de PSI semble impliquée dans le contrôle de l'état rédox de la cellule [56].

## 9. Photoinhibition et dissipation d'énergie

Dans leur environnement naturel, les organismes photosynthétiques sont soumis à de fortes fluctuations de l'intensité lumineuse. Une exposition en forte lumière conduit à une augmentation du flux d'électrons, qui se traduit par une augmentation de fixation de carbone inorganique. Mais au delà d'un certain seuil, la fixation de carbone devient limitante, et la photosynthèse est incapable d'utiliser toute l'énergie collectée par les antennes photosynthétiques (la concentration de CO<sub>2</sub> devient limitante). L'excès d'excitation des antennes peut se traduire par une persistance de l'état excité de la chlorophylle *a* (état singulet), et donc la production d'une chlorophylle triplet et d'oxygène singulet extrêmement réactif. L'excès de lumière se traduit également par la consommation des réserves en NADP<sup>+</sup>,

ce qui entraîne une augmentation du flux d'électrons depuis le PSI vers l'oxygène, et donc la génération d'ions superoxyde, et de peroxyde d'hydrogène.

Les organismes photosynthétiques disposent de plusieurs stratégies pour gérer le flux d'électrons dans les photosystèmes.

Dans les réponses efficaces à court terme, nous avons vu que les caroténoïdes permettent la détoxification et limitent l'apparition d'oxygène singulet. Par ailleurs, les enzymes de détoxification comme la SOD permettent de prendre en charge les ERO (Especes Reactives de l'Oxygène) au niveau de la membrane et du stroma.

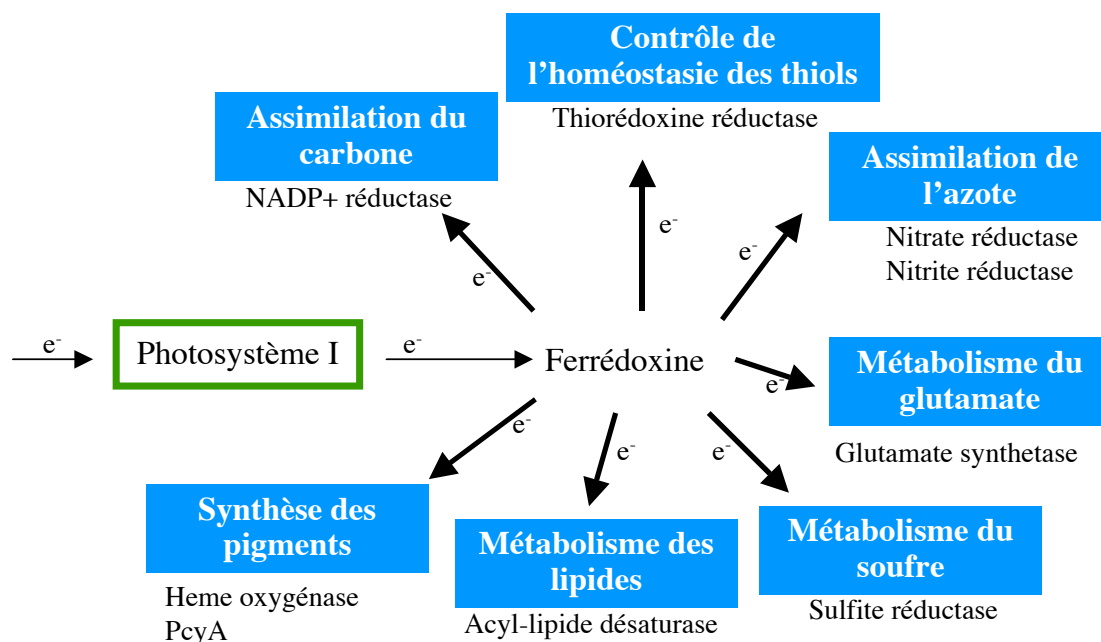
Chez les plantes et les algues, où les antennes sont uniquement chlorophylliennes, les chlorophylles excitées peuvent revenir à leur état stable par différentes voies. L'énergie d'excitation peut être 1) réémise sous forme de fluorescence, 2) transmise aux photosystèmes, 3) dissipée sous forme thermique (NPQ) ou 4) décroître en donnant un état triplet de la chlorophylle, qui lui même peut évoluer vers la production d'oxygène singulet [57].

Ce système n'est pas équivalent chez les cyanobactéries dont les antennes collectrices de lumière contiennent des phycobiliprotéines et des chlorophylles. En condition de stress lumineux ou de carence en fer, certaines cyanobactéries comme *Synechocystis* et *Synechococcus* synthétisent la protéine IsiA, un homologue à la protéine de coeur des antennes du PSII : Cp43 (=PsbC). IsiA intervient à plusieurs niveaux de la protection de l'appareil photosynthétique. Elle fixe la chlorophylle avec une grande efficacité, et fonctionnerait comme une antenne alternative de photons autour du PSI [58]. Par ailleurs, IsiA protège le PSII d'une surexcitation en séquestrant l'énergie surnuméraire des chlorophylles. Cette dissipation semble déclenchée par la lumière bleue, et est proportionnelle à l'intensité lumineuse [59].

## 10. Photosynthèse et métabolisme général

Le flux d'électrons issus de la photosynthèse sert à alimenter toutes les réactions de tous les métabolismes cellulaires (illustré en Figure 11) [54], [60], [61] dont principalement:

- Production d'énergie (ATP)
- Réduction du NADPH (transfert d'électrons à de nombreux partenaires)
- Voies métaboliques d'assimilation du carbone, de l'azote et du soufre inorganique.



**Figure 11 : Le flux d'électrons issus de la photosynthèse sert à alimenter l'ensemble du métabolisme.** PcyA : phycocyanobilin ferredoxin oxydoreductase

## 11. L'assimilation du carbone

Les réactions obscures de la photosynthèse impliquent l'incorporation du  $\text{CO}_2$  par le cycle de Calvin-Bensson-Bassham, puis sa réduction en glucides en utilisant l'énergie et le pouvoir réducteur produits au cours de la phase lumineuse.

De nombreuses cyanobactéries ont développé un système inductible leur permettant de survivre en présence de faibles teneurs en  $\text{CO}_2$ . Cette adaptation est due à un mécanisme de

concentration du  $\text{CO}_2$  (CCM) et comporte différents types de transport du carbone : transporteurs de bicarbonate, transporteurs de  $\text{CO}_2$  spécifiquement associés avec des NADH-deshydrogénases du complexe I (NDH-I) [62]. Une fois dans la cellule, le carbone est stocké sous forme de  $\text{HCO}_3^-$ , et sert au fonctionnement de l'enzyme primaire de fixation du  $\text{CO}_2$ : la carboxylase-oxygénase du ribulose diphosphate (Rubisco) [61].

## B. La respiration

Le processus respiratoire se décompose en 4 étapes : la glycolyse, la formation de l'acétyl CoA, le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs) et le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Ce processus permet la formation de molécules d'ATP et la réduction du  $\text{NADP}^+$  cellulaire en NADPH. Les électrons issus de la glycolyse et du cycle de l'acide citrique sont pris en charge par les cytochromes au niveau de la chaîne respiratoire. Leur transfert est réalisé au cours de cascades d'oxydoréductions entraînant la libération de protons dans l'espace intermembranaire mitochondriale ou dans le périplasme des procaryotes. Le passage des protons  $\text{H}^+$ , suivant leur gradient de concentration, vers la matrice mitochondriale ou vers le cytoplasme active les ATP Synthases (description du mécanisme moléculaire [63]).

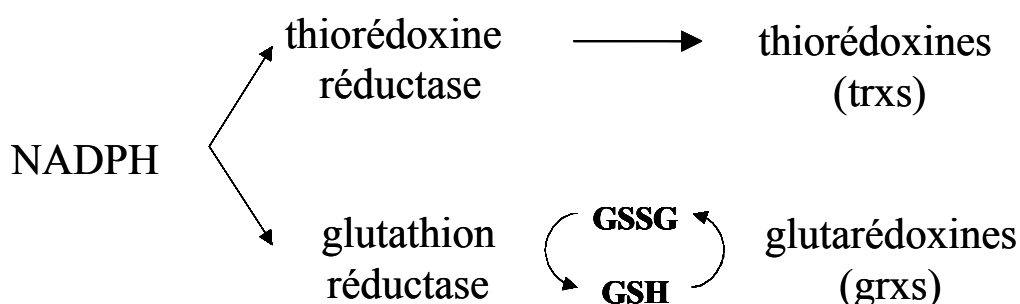
Outre l'aspect énergétique, la chaîne respiratoire est la principale source cellulaire de production d' $\text{O}_2^-$  [64]. La réduction complète de l'oxygène entraîne la production d'ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène) (voir chapitre V).

## Chapitre III Les deux voies de contrôle de l'homéostasie des thiols

Deux voies *a priori* distinctes de contrôle de l'homéostasie des thiols ont été décrites initialement chez les organismes modèles non-photosynthétiques *E. coli* et *S. cerevisiae* (pour revues [65], [66]). Si les acteurs protéiques sont présents dans l'ensemble du règne vivant, leurs connections sont différentes. Des inter-relations sont observées entre ces deux voies métaboliques.

### I. Le contrôle de l'homéostasie des thiols chez les organismes modèles non-photosynthétique

Ces deux voies de contrôle de l'homéostasie des thiols ont été décrites chez *E. coli*, et *S. cerevisiae* ainsi que chez l'homme [67]. Dans ces organismes, on considère que ces deux voies sont indépendantes (Figure 12).



**Figure 12 : Les deux voies de contrôle du métabolisme rédox.** GSH glutathion réduit, GSSG glutathion oxydé

Ces deux systèmes semblent avoir des fonctions et des cibles moléculaires redondantes mais aussi des fonctions qui leur sont spécifiques. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, une étude a montré que l'inactivation de tous les gènes codant pour les thiorédoxines et glutarédoxines à dithiol ( $\Delta trx1 \Delta trx2 \Delta grx1 \Delta grx2$ ) n'est pas possible, le mutant n'est pas viable. En revanche, une seule thiorédoxine ou glutarédoxine est suffisante à la viabilité cellulaire (étude des mutants  $\Delta grx1 \Delta grx2 \Delta trx1$ ,  $\Delta grx1 \Delta grx2 \Delta trx2$ ,  $\Delta grx1 \Delta trx1 \Delta trx2$  et  $\Delta grx2 \Delta trx1 \Delta trx2$ ). Cela signifie que les fonctions rédox critiques de la cellule sont garanties et par les thiorédoxines et par les glutarédoxines. Des phénotypes particuliers (notamment dans l'assimilation du soufre

et de la croissance en anaérobiose) indiquent toutefois que des voies spécifiques impliquent ces deux familles d'enzymes [68].

## II. Les acteurs du contrôle de l'homéostasie des thiols

**La thiorédoxine réductase (TR).** Cette enzyme appartient à la famille des pyridine disulfide oxidoréductases qui comprend également la glutathion réductase et la réductase du mercure (MerA) (voir Chapitre V partie III.B.2). La thiorédoxine réductase réduit les thiorédoxines de façon directe.

La thiorédoxine réductase, présente chez tous les organismes, des bactéries à l'homme, peut exister sous deux formes différentes ([69, 70]). En dépit de caractéristiques structurales très différentes, ces deux formes ont la même fonction.

Les thiorédoxines réductases du premier groupe sont dites « de faible poids moléculaire » (c'est un homodimère de 35 kDa). Elle sont présentes chez les bactéries et la levure *S. cerevisiae*. Elles sont très homologues à la thiorédoxine réductase d'organismes photosynthétiques ([71]).

A titre d'illustration, la thiorédoxine réductase d'*A. thaliana* a été purifiée et cristallisée [72]. Il s'agit d'une flavoprotéine (présence d'un co-facteur FAD). Chaque dimère possède deux domaines : le premier possède un site de liaison au NADPH, le deuxième un site de liaison au FAD. Le repliement tridimensionnel permet le rapprochement de ces deux sites, facilitant donc la réduction du co-facteur FAD par le NADPH fixé. Face au site de liaison du FAD, se trouve le site actif disulfure : la cystéine catalytique (C-terminale) est la plus proche du FAD. Celui-ci peut transmettre deux électrons à la fois, permettant une réduction intramoléculaire du site actif.

Les thiorédoxine réductases du deuxième groupe sont dites « de haut poids moléculaire ». Elles sont présentes dans les cellules de mammifères. Elles sont composées d'un homodimère de 55 kDa, dont la taille est bien supérieure à celles des thiorédoxine réductases du premier groupe (35 kDa). Elles ont les mêmes caractéristiques fonctionnelles que celles du premier groupe (co-facteur FAD, site actif disulfure) et possèdent en outre une sélénocystéine dans sa partie C-terminale, qui lui conférerait des propriétés anti-oxydantes originales [73].

**Les thiorédoxines (Trxs).** Les thiorédoxines catalysent la réduction de ponts disulfures grâce à une activité thiol-transférase conférée par la présence dans son site actif de deux cystéines au sein du motif conservé, CGPC. Elles peuvent réduire un pont disulfure grâce à un



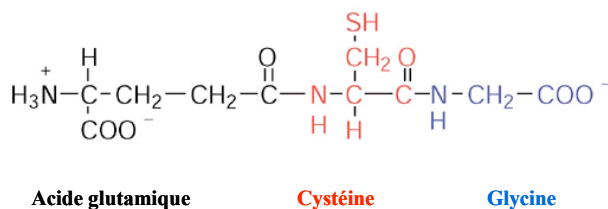
processus catalytique en deux étapes [74]. Une fois oxydées, ces protéines peuvent être réduites par la thiorédoxine réductase [75]. L'abondance et le potentiel redox très bas (-270 mV pour Trx1 chez *E. coli*) des thiorédoxines [75] en font des thiol-réductases majeures.

Les thiorédoxines sont présentes chez tous les organismes, en quantité variable. De façon générale, on distingue les différents types en fonction de leur localisation cellulaire. Ainsi, on retrouve toutes les familles de thiorédoxines chez les végétaux supérieurs, organismes possédant mitochondries et chloroplastes. Les plantes en possèdent généralement un grand nombre (*A. thaliana* en possède 19) réparties en 6 familles : *h*, *f*, *m*, *o*, *x* et *y* ([76] [77]). On trouve les familles *f*, *m*, *x* et *y* dans le chloroplaste, la famille *h* dans le cytosol et le réticulum endoplasmique ([78] [79] [80]).

**La glutathion réductase (GR).** Comme la thiorédoxine réductase, la glutathion réductase appartient à la famille des pyridine disulfide oxydoréductases. Elle catalyse la réduction du glutathion cellulaire oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). La glutathion réductase est une flavoprotéine possédant un co-facteur FAD lui permettant d'utiliser directement le pouvoir réducteur du NADPH. Cette flavoprotéine a une taille de 51 kDa chez l'Homme. Son site actif disulfure est réduit intramoléculairement par le FAD, par un mécanisme similaire à celui de la thiorédoxine réductase [81], [82].

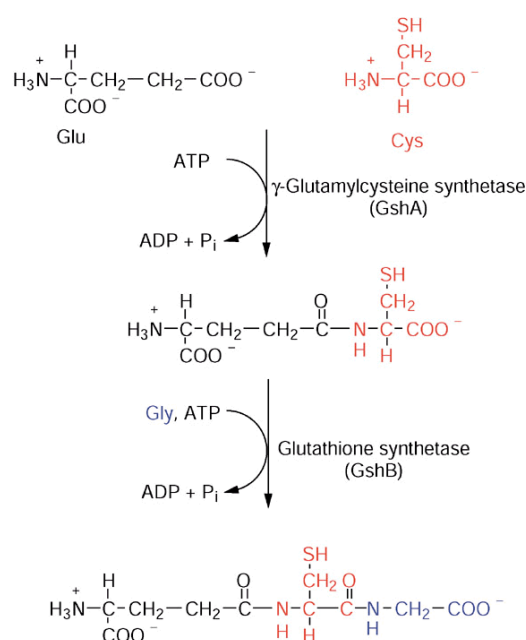
**Le glutathion : peptide clef ou facultatif ?** Le glutathion est un tripeptide comprenant un acide glutamique, une cystéine et une glycine (Figure 13). Ce composé est le plus petit peptide cellulaire pourvu d'un groupement thiol actif. Celui-ci est présent chez la majorité des organismes.

La cystéine et la glycine sont liées par une liaison peptidique. La liaison entre l'acide glutamique et la cystéine est une liaison amide entre la fonction acide du radical de l'acide glutamique et la fonction amine de la cystéine. Le glutathion est finalement le  $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine. Par la fonction thiol du radical de la cystéine, le glutathion peut exister sous une forme réduite (GSH, représentée ci-dessous) ou sous une forme oxydée (GSSG) dans laquelle deux molécules de glutathion sont liées par un pont disulfure. Le glutathion réduit et le glutathion oxydé constituent un couple d'oxydo-réduction dont le potentiel standard est de  $-230$  mV (le NADPH a un potentiel de  $-315$  mV). Ce potentiel fait du glutathion un très bon réductant cellulaire. Le glutathion sert de coenzyme transporteur d'hydrogène destiné principalement à maintenir les protéines à l'état réduit (glutarédoxine, hémoglobine, ...).



**Figure 13 : Formule développée du glutathion.**

Sa synthèse est réalisée *in vivo* en deux étapes (Figure 14). La première étape, catalysée par la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthetase (GshA), assure la formation d'une liaison entre un acide glutamique (Glu) et une cystéine (Cys). Cette étape consomme une molécule d'ATP. Au cours de la deuxième étape, catalysée par la glutathion synthetase (GshB), une glycine (Gly) est liée à la cystéine. Cette étape consomme une nouvelle molécule d'ATP.



**Figure 14 : Voie de synthèse du glutathion (sous sa forme réduite, GSH).**

Le glutathion (GSH) est décrit comme un puissant antioxydant. Des souches de *S. cerevisiae* dépourvues de GSH sont sensibles au stress oxydant produit par les ions peroxydes ou superoxydes [83] [84]. En phase exponentielle de croissance, le glutathion est abondant (concentrations de l'ordre du millimolaire) [85] et le rapport GSH/GSSG élevé (environ 10 chez *S. cerevisiae*) [86].

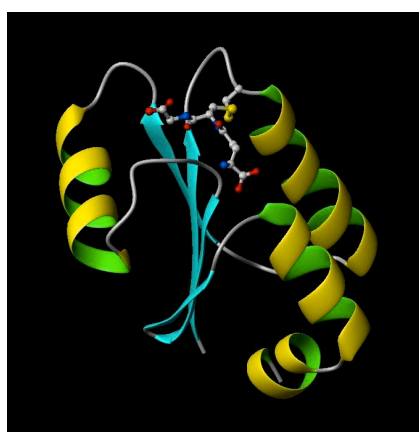
Si le glutathion est essentiel à la viabilité de *S. cerevisiae* [87], il ne l'est pas à celle d'*E. coli*, chez qui il ne semble pas jouer de rôle particulier dans la réponse au stress provoqué par le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [88].

*In vivo*, la réduction du glutathion est assurée chez la majorité des organismes par la

glutathion réductase. Cette enzyme catalyse cette réaction en utilisant directement le pouvoir réducteur du NADPH, via son co-facteur FAD. Il a néanmoins été démontré chez *E.coli* que la glutathion réductase n'est pas indispensable à la viabilité cellulaire et au maintien du rapport GSH/GSSG [89]. Chez *S. cerevisiae*, le mutant se développe en conditions standard de la même façon que la souche sauvage ; il est en revanche plus sensible au stress oxydant provoqué par le diamide. Son inactivation entraîne une augmentation de la proportion de glutathion oxydé (GSSG). La présence d'au moins une des deux thiorédoxines cytoplasmiques est indispensable à la viabilité cellulaire de ce mutant [90]. Ceci permet d'émettre deux hypothèses : ou bien les systèmes thiorédoxine et glutarédoxine sont redondants chez cet organisme, ou bien la néo-synthèse de glutathion réduit est suffisante en conditions standard pour assurer une réduction suffisante des réductants de ce composé.

**Les glutarédoxines (Grxs).** Les glutarédoxines ont été découvertes chez *E. coli* comme donneur d'électrons à la ribonucleotide réductase [91], fonction attribuée préalablement aux thiorédoxines [92].

Les glutarédoxines appartiennent à la famille des thiorédoxines. Bien que leurs séquences primaires soient faiblement homologues, leur structure tridimensionnelle est similaire. Celle-ci (appelée « Thiorédoxin Fold ») (Figure 15) se compose de quatre feuillets bêta situés au cœur hydrophobe de la protéine. Ils sont entourés de trois hélices alpha (comme décrit initialement par [35]). Le site actif CXXC est situé à la surface de la protéine, au sommet formé par les trois hélices, ce qui lui confère une grande accessibilité.



**Figure 15 : Structure RMN de GrxC d'*E. coli*.** Le site actif est présent au sommet de la protéine [93]

Elles sont réduites directement par le glutathion (GSH) [91]. Cette propriété les différencie des thiorédoxines et est à la base de leur appellation. Leur potentiel rédox est

très bas, du même ordre de grandeur que celui des thiorédoxines (-233 mV et -198 mV pour Grx1 et Grx3 d'*E. coli* respectivement [94]).

Les glutarédoxines sont présentes dans tous les compartiments cellulaires (noyau, cytosol, organites) (elles peuvent aussi être sécrétées [95]).

Cette famille sera particulièrement analysée dans la partie IV de ce Chapitre.

### III. Les voies thiorédoxine et glutarédoxine interagissent

Les études réalisées chez les organismes modèles *S. cerevisiae* et *E. coli* ne peuvent rendre compte de la diversité des systèmes de contrôle de l'homéostasie des thiols existants. Dans cette partie, je présente des études récentes, réalisées dans des organites cellulaires (ex : mitochondrie) et dans différents modèles biologiques (ex : *Plasmodium falciparum*, *Anopheles Gambiae* ou *Drosophila melanogaster*). Ces études ont mis en évidence des interactions entre les systèmes thiorédoxine et glutarédoxine.

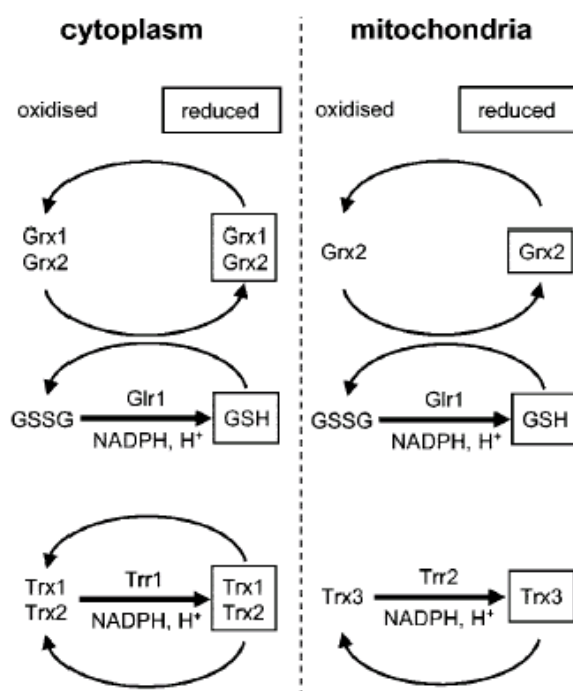
#### A. Le contrôle de l'homéostasie des thiols dans les mitochondries

Chez les eucaryotes, un système propre aux mitochondries a été décrit [96]. Le système de contrôle de l'homéostasie des thiols mitochondrial est très semblable au système cytosolique.

**Système thiorédoxine.** La thiorédoxine réductase et les thiorédoxines mitochondriales sont généralement codées par le génome nucléaire et sont homologues aux thiorédoxines réductases et thiorédoxines cytosoliques. Elles possèdent une séquence d'adressage mitochondrial clivable supplémentaire [97]. On trouve les thiorédoxines de la famille *o* et les types At7 et At8 de la famille *h* dans la mitochondrie. Ces thiorédoxines sont réduites par une thiorédoxine réductase mitochondriale [71].

La composition du système thiorédoxine mitochondrial (Trr2, Trx3) de *S. cerevisiae* est similaire à celle de son système cytosolique (Trr1, Trx1 et Trx2). Ces deux systèmes fonctionnent indépendamment. La différence majeure entre ces deux systèmes est que l'état rédox de Trx3 est à la fois sous le contrôle de Trr2 mais aussi sous celui de la glutathion réductase mitochondrial (Glr1) (voir ci-après) [98]. Dans cette étude, l'état rédox de Trx3 est observé dans différents contextes génétiques ( $\Delta trr2$ ,  $\Delta glr1$ ). Les mécanismes d'interactions ne sont pas abordés.

**Système glutarédoxine.** Chez *S.cerevisiae*, la glutathion réductase (Glr1) et une glutarédoxine (Grx2) sont colocalisées dans le cytoplasme et dans la mitochondrie. Les deux formes sont issues de la même phase codante, possédant deux sites d'initiation de la traductions différents (présence d'une séquence d'adressage mitochondriale ou non) [99] [100]. *A contrario* Grx1 n'est présente que dans le cytoplasme (Figure 16).



**Figure 16 : Comparaison des systèmes thiorédoxine et glutarédoxine cytosolique et mitochondrial chez *S. cerevisiae*.** D'après [98]. GSH : glutathion réduit, GSSG glutathion oxydé, Grx : glutarédoxine, Trx : thiorédoxine.

Dans les cellules humaines, deux glutarédoxines ont été identifiées. La première, Grx1, est cytosolique et possède un site actif CPYC. La deuxième, Grx2, est mitochondriale et nucléaire, et possède un site actif CSYC. Des tests d'activité *in vitro* ont permis de mettre en évidence que Grx2 a la propriété d'être réduite indépendamment par le glutathion (GSH) et la thiorédoxine réductase [101]. Cette étude montre à nouveau une interaction entre les systèmes thiorédoxine et glutarédoxine.

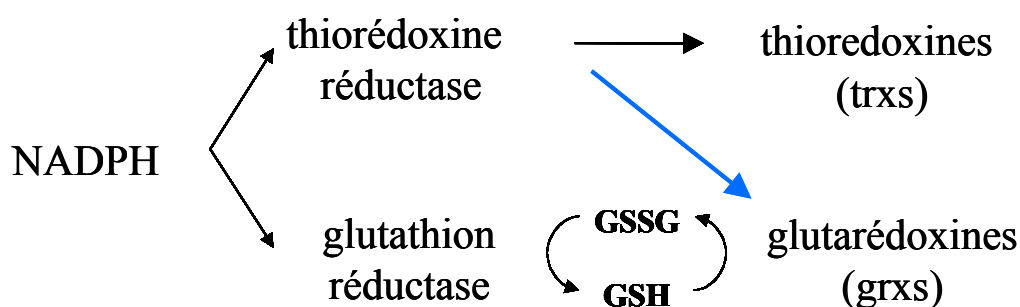
## B. Diversité des systèmes de contrôle de l'homéostasie des thiols

L'étude des systèmes de contrôle de l'homéostasie des thiols chez divers organismes a permis de mettre en évidence des nouvelles voies de réduction. Chez certains d'entre eux de

nouveaux acteurs comme par exemple l'acide lipoïque dans les mitochondries du pathogène *Plasmodium falciparum* peuvent intervenir en plus des systèmes thiorédoxine et glutarédoxine [102].

Chez certains organismes, pourtant pourvus d'une glutathion réductase, des interactions entre la thiorédoxine réductase et des glutarédoxines ont été observées.

Deux études récentes étendent les voies de réduction des glutarédoxines chez l'homme (Grx2 mitochondriale, glutarédoxine à dithiol, voir partie IV.A de ce Chapitre) [103] et chez *E. coli* (Grx4, glutarédoxine à monothiol, voir partie IV.A de ce Chapitre) [104] (Figure 17).

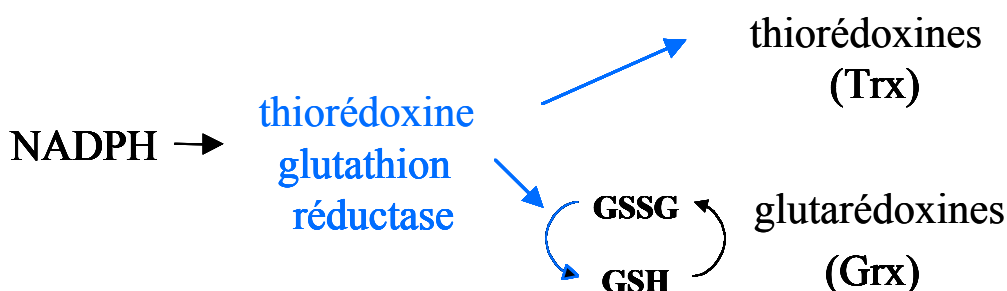


**Figure 17 : Système de réduction des glutarédoxines passant par le glutathion (GSH) ou la thiorédoxine réductase.** Exemple de la Grx2 mitochondriale humaine [103] et de la Grx4 d'*E. coli* [104]. GSSG : glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit.

Ces glutarédoxines ont la propriété d'être réduites par le glutathion cellulaire réduit (GSH) et donc d'être classées dans la famille des glutarédoxines (présence d'un site de fixation du glutathion caractéristique, voir partie IV de ce Chapitre).

Elles ont aussi la propriété d'être réduites par la thiorédoxine réductase, via un mécanisme disulfure classique entre les cystéines de leurs sites actifs (identique au mécanisme de réduction des thiorédoxines [105]). Ce mécanisme est indépendant de la présence de glutathion [103], [104].

Enfin, des systèmes originaux ont été identifiés chez certains parasites. Une étude met en évidence l'existence d'enzymes possédant à la fois la fonction glutathion réductase et la fonction thiorédoxine réductase (Figure 18). Chez ces organismes, les voies « thiorédoxine » et « glutarédoxine » sont fusionnées.



**Figure 18 : Système de contrôle de l'homéostasie des thiols basé sur une unique thiorédoxine glutathion réductase.** Exemple des parasites *Schistosoma mansoni* et *Taenia crassiceps metacestode* [106], [107]. GSSG : glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit.

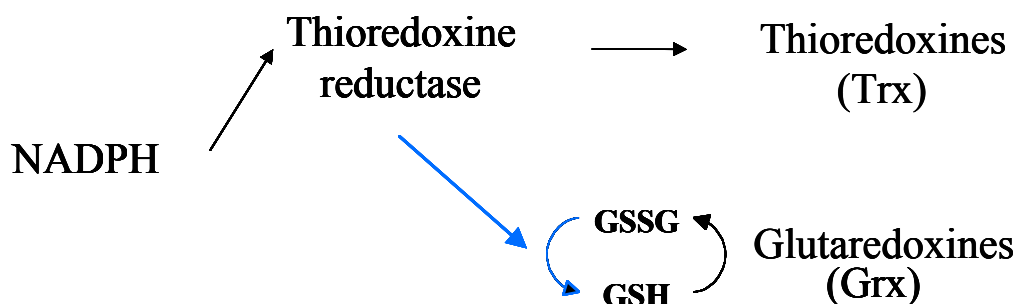
*Schistosoma mansoni* est un parasite responsable d'une maladie humaine, la schistosome. Cet organisme est hébergé dans le foie. Il est très exposé aux ERO issus de la respiration (voir Chapitre V) et doit posséder un système de contrôle de l'homéostasie des thiols particulièrement performant. Une enzyme appelée thiorédoxine glutathion réductase remplace ainsi la thiorédoxine réductase et la glutathion réductase en combinant leurs fonctions respectives. La séquence de cette protéine est une fusion des séquences de ces deux protéines [106].

Chez le vers *Taenia crassiceps metacestode*, une enzyme aux propriétés similaires a été purifiée et caractérisée [107]. Les deux activités enzymatiques de cette enzyme sont abolies par la présence d'auranofin (composé d'or), ce qui suggère que cette enzyme possède un résidu de sélénocystéine, semblable à celui qui a été mis en évidence chez les thiorédoxine réductases du groupe dit « à haut poids moléculaire » (voir partie II de ce Chapitre).

D'un point de vue évolutif, on pourrait émettre l'hypothèse que la thiorédoxine glutathion réductase serait une forme ancestrale de la glutathion réductase et de la thiorédoxine réductase. Le parasitisme privilégierait encore aujourd'hui une forme compactée de ces deux enzymes.



D'autres organismes possèdent des systèmes de contrôle de l'homéostasie des thiols dépourvus de glutathion réductase (sur la base de l'homologie de séquence) tels qu'*Anopheles Gambiae* ou *Drosophila melanogaster* [108], [109] (Figure 19).



**Figure 19 : Système de contrôle de l'homéostasie des thiols chez des organismes dépourvus de glutathion réductase (GR).** Exemples des organismes *Anopheles Gambiae* et *Drosophila melanogaster* [108], [109], [110]. GSSG : glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit

Des dosages d'activité sur des extraits bruts totaux ont montré l'existence d'une activité glutathion réductase. Les meilleurs homologues de la glutathion réductase (réductase du mercure (MerA) et dihydrolipoamide deshydrogenase) ne possèdent pas cette activité [109]. Des analyses plus approfondies ont montré que la thiorédoxine réductase purifiée de ces organismes était fonctionnelle et possédait également une activité glutathion réductase [108], [109]. Cette étude montre bien qu'une même fonction (ici la fonction glutathion réductase) peut être assurée par des enzymes différentes d'un organisme à l'autre. La thiorédoxine réductase a un rôle clé dans ces organismes, car l'utilisation du pouvoir réducteur issu du NADPH dans ce système est centré sur cette enzyme.

Chez les cyanobactéries, il est possible de classer les différentes espèces en deux catégories. Sur la base de l'homologie de séquences avec la glutathion réductase d'*E. coli*, certaines possèdent une glutathion réductase (ex : *Anabaena* sp. PCC7120, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1), d'autres ne la possèdent pas (*Synechocystis*, *Synechococcus* sp. WH8102).

L'étude des systèmes de contrôle de l'homéostasie des thiols chez différents organismes modèles a permis de mettre en évidence des interactions entre les deux voies précédemment décrites comme indépendantes. Chacune des nouvelles voies de réduction identifiées implique des glutarédoxines.

Je vais désormais définir les caractéristiques et les propriétés catalytiques de ces enzymes,

afin de comprendre les mécanismes moléculaires étant à la base de ces propriétés originales.

## IV. Structure, fonction des glutarédoxines

### A. Les grandes familles de glutarédoxines

A ce jour, il n'existe pas de classification des glutarédoxines aussi détaillée que celle des thiorédoxines (voir partie II de ce Chapitre). On distingue uniquement deux groupes de glutarédoxines : celles dites à dithiol, possédant un site actif disulfure CXXC, et celles dites à monothiol, dont la cystéine C-terminale du site actif est substituée par une sérine (CXXS).

Les glutarédoxines à dithiol possèdent un site actif ayant la capacité de s'oxyder en formant un pont disulfure intramoléculaire (entre les deux cystéines du site actif). Les glutarédoxines à monothiol n'ont pas cette propriété.

Les deux types de glutarédoxines réduisent les ponts disulfures par des mécanismes différents [111]. Le mécanisme « dithiol » est similaire à celui des thiorédoxines et implique la formation d'un pont disulfure intermoléculaire transitoire, entre la glutarédoxine et sa cible, suite à l'attaque nucléophile de la cystéine N-terminale du site actif (voir Chapitre II partie I.B.3). Le mécanisme « monothiol » a été déduit grâce à l'analyse de mutants dépourvus de glutarédoxines à dithiol « classiques » (CXXC). Les glutarédoxines à monothiol réduisent un mélange disulfure formé de la protéine oxydée et d'une molécule de glutathion (reliés par un pont disulfure). Cette réduction implique une autre molécule de glutathion réduit pour obtenir au final le glutathion sous sa forme oxydée et la glutarédoxine sous sa forme régénérée (réduite).

Les glutarédoxines à dithiol peuvent réduire les protéines disulfures oxydées et les mélanges disulfures formés entre une protéine oxydée et une molécule de glutathion alors que les glutarédoxines à monothiol ne peuvent *a priori* réduire que ces dernières [111].

Une nouvelle sous-famille des glutarédoxines à monothiol a été récemment caractérisée. Ces nouvelles glutarédoxines ont une séquence primaire très conservée entre elles mais très différente de celle des glutarédoxines à dithiol. Leur site actif a une séquence elle aussi très conservée CGFS. Cette famille a été nommée PICOT (Protein kinase C-Interacting Cousin Of Thiorédoxin) car le premier exemple décrit est une protéine qui interagit avec une protéine kinase de type  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant PKC $\square$ . La surexpression de cette PICOT inhibe l'activation de la c-jun N-terminal kinase dans des cellules lymphocytaires de type T [112]. Une

deuxième glutarédoxine de type PICOT a également été décrite (par homologie) chez *Plasmodium falciparum* (qui possède en outre une autre glutarédoxine à dithiol classique de type CPYC). Les alignements de séquence primaire de cette deuxième glutarédoxine de type PICOT décrite avec d'autres membres de cette famille sont très forts [113]. Enfin, une troisième glutarédoxine de type PICOT (CXIP-1) d'*Arabidopsis Thaliana* active un transporteur de  $\text{Ca}^{2+}$  (CAX1) [114].

Jusqu'à maintenant ce sont les seuls exemples de glutarédoxines de cette famille dont la fonction a été définie. Ces différentes études attribuent aux glutarédoxines de type PICOT des fonctions variées et ne corréle pas leur originalité structurale à une fonction cellulaire spécifique.

Une classification plus récente [115] indique l'existence d'un nouveau groupe de glutarédoxines. Ce troisième groupe (représenté par Grx2 d'*E. coli*) correspond à des glutarédoxines présentant plus d'homologies de séquence avec la famille des glutathion-S-transferases (GST) qu'avec les glutarédoxines. En effet, si elle possède un domaine glutarédoxine classique de 72 acides aminés, elle possède également un domaine structurellement très homologue à la GST. Les enzymes appartenant à ce dernier groupe n'obéissent pas aux critères de taille des glutarédoxines (9 à 12 kDa) mais possèdent bien une activité glutarédoxine [116].

La classification des glutarédoxines est arbitraire, de nouvelles formes de glutarédoxines sont très certainement encore à découvrir. A titre illustratif, chez *A. thaliana*, une glutarédoxine possédant un site actif de type CCXC/S/G a été récemment décrite [117]. Nous sommes ici aux limites de la classification des glutarédoxines.

## B. Les glutarédoxines sont ubiquistes

**Elles sont présentes dans l'ensemble du règne vivant.** Leur nombre est très variable d'un organisme à l'autre : 3 glutarédoxines sont présentes chez *Synechocystis*, 4 chez *E. coli*, 5 chez *S. cerevisiae* et jusqu'à 31 chez *A. thaliana*. Les microorganismes comme *Synechocystis*, *E. coli* ou *S. cerevisiae* en possédant un faible nombre, sont des modèles d'étude particulièrement adaptés. Toutefois, le grand nombre de glutarédoxines présentes chez *A. thaliana* est certainement à relier avec des fonctions cellulaires importantes, à découvrir, de ces protéines dans cet organisme. Beaucoup d'entre elles sont identifiées par homologie de séquence et n'ont pas été caractérisées expérimentalement [1].

Le

Tableau 1 présente les organismes dont les glutarédoxines ont été identifiées et analysées.

<b>Procaryotes</b>	<i>E. coli</i>	[91]
	<i>Synechocystis</i>	<u>Nos travaux</u>
<b>Virus</b>	Bacteriophage T4	[118]
	Vaccinia virus	[119]
	HIV	[120]
<b>Eucaryotes non photosynthétiques</b>	<i>S. cerevisiae</i>	[121, 122] [66]
	<i>P. falciparum</i>	[113]
	Lapin	[123]
	<i>Homo sapiens</i>	[124, 125]
<b>Eucaryotes photosynthétiques</b>	Riz	[126], [127]
	Epinard	[128]
	<i>Populus tremula</i>	[129]
	<i>A. thaliana</i>	[130]

**Tableau 1 : Les glutarédoxines sont présentes chez la plupart des organismes vivants.**

Peu de choses sont vraiment connues sur les glutarédoxines. Jusqu'en 2001, une seule enzyme appartenant à cette famille était décrite chez l'homme [103]. Aujourd'hui, au moins trois d'entre elles y ont été identifiées et caractérisées [101].

**Les glutarédoxines d'organismes photosynthétiques.** Comme nous venons de le décrire, les organismes photosynthétiques eucaryotes possèdent un grand nombre de glutarédoxines. L'importance du métabolisme rédox chez les organismes photosynthétiques rend centrale la connaissance du fonctionnement de ces enzymes dans ces organismes.

Outre *Synechocystis* (mon travail de thèse), les deux organismes photosynthétiques modèles dans lesquels les glutarédoxines sont analysées sont *A. thaliana* et *Populus trichocarpa* (peuplier) [1]. Chez *Chlamydomonas*, une grande étude phylogénétique a été réalisée [115], [131], aucun résultat expérimental n'est cependant disponible.

*A. thaliana* contient 31 gènes codant pour des glutarédoxines (ou assimilées) (site MATDB : <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>). Ces gènes sont présents sur 5 chromosomes nucléaires différents. 17 d'entre elles sont à dithiol, 14 sont à monothiol. Des analyses bioinformatiques prédisent les localisations cellulaires (cytosol, chloroplaste, mitochondrie, sécrétion) de ces différentes glutarédoxines, mais aucun travail expérimental n'a confirmé ces

résultats. Dans cet ensemble hétérogène, on peut distinguer 3 groupes de glutarédoxines : le premier possède le site actif classique CPYC, le second possède un site actif original CCXC/S/G et enfin le troisième groupe possède un site monothiol CGFS ([115], [1]).

*Populus trichocarpa* contient au moins 19 gènes codant pour des glutarédoxines (son génome n'est pas entièrement annoté) (site <http://www.jgi.doe.gov/poplar/>). L'une d'elles a la propriété de réduire la 3'-phosphoadenylylsulfate réductase. Son implication dans la tolérance de certains agents oxydants (peroxyde d'hydrogène et ménadione) a été montrée [132].

### C. Glutarédoxines : enzymes et modules.

Le récent décryptage de génomes d'organismes variés a permis d'identifier de nouvelles séquences très homologues à des glutarédoxines. Des domaines homologues aux glutarédoxines ont été trouvés au sein de séquences codantes de grande taille (plusieurs kb). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse de l'existence de partenaires fusionnés ou de nouvelles fonctions des glutarédoxines. S'il est théoriquement possible d'identifier les glutarédoxines d'un organisme en utilisant les outils bioinformatiques disponibles, en revanche, il n'est pas facile d'identifier des protéines possédant des modules glutarédoxines (faible homologie entre ces protéines de fusion dans leur séquence complète et les glutarédoxines).

Certaines études mettent clairement en évidence l'existence de ces modules catalytiques inclus dans des protéines de fusion. Ainsi, la 5'-adenylylsulfate (APS) réductase d'*A. thaliana* possède un domaine en C-terminal ayant la fonction catalytique d'une glutarédoxine en présence d'un mélange de glutathion oxydé (GSH) et d'hydroxyethyl disulfide (HED) (formant un substrat classique des glutarédoxines (voir Matériel/Méthodes) [133]. Une thiorédoxine réductase fusionnée à une glutarédoxine a été identifiée et caractérisée dans des cellules de mammifère. Cette enzyme, appelée TGR (Thiorédoxine Glutathion réductase) a la propriété de réduire les thiorédoxines, le glutathion (GSSG) mais aussi les ponts disulfures intermoléculaires. Cette dernière propriété est liée à la présence d'un module glutarédoxine dans sa séquence [134].

D'autre part, la thiorédoxine réductase 1 de mammifère possède plusieurs isoformes (jusqu'à 6) obtenus par épissage alternatif. L'un d'entre eux est composé de la fusion entre un module de thiorédoxine réductase classique et un module de glutarédoxine avec un site actif particulier CTRC [135].

D'autre part, chez les procaryotes, les gènes codant pour deux protéines interagissant

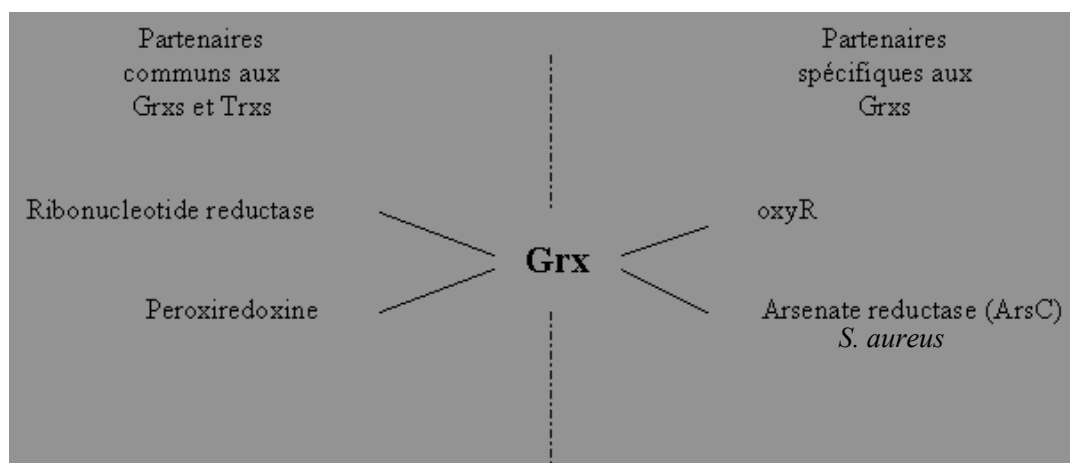
ensemble sont souvent associés dans un même environnement génétique, voire en opéron, voire même sont fusionnés. Nous pouvons illustrer ce phénomène, très observé, mais peu démontré expérimentalement, chez l'algue rouge *Gracilaria gracilis*. Chez ce microorganisme, une protéine fonctionnelle est constituée de deux modules de glutarédoxines fusionnés à une méthionine sulfoxyde réductase en N-terminal, ces trois séquences codantes étant situées dans le même environnement génétique. L'activité de cette protéine est la résultante de l'activité des 3 modules la composant (Rouhier, N *et al*, résultats non publiés).

#### D. Différentes onctions cellulaires des glutarédoxines

##### 1. La fonction réductrice des glutarédoxines

Le contrôle du métabolisme rédox peut être défini comme le contrôle de l'état rédox des enzymes impliquées dans les différents processus rédox. Un certain nombre d'enzymes réduites par les glutarédoxines ont été décrites (Figure 20). Certaines de ces cibles sont communes avec les thiorédoxines, d'autres leur sont spécifiques. Les glutarédoxines ne seraient pas un simple système redondant du système thiorédoxine, comme cela a longtemps été supposé [65].

Le schéma présenté en Figure 20 illustre partiellement ces spécificités d'interaction. La ribonucleotide réductase d'*E. coli* et les peroxirédoxines de mammifère peuvent aussi être réduites à la fois par les glutarédoxines et par les thiorédoxines [36, 91], [136], [137]. En revanche, le facteur de transcription OxyR et la réductase de l'arsenic (ArsC) de *S. aureus* (voir Chapitre IV partie III.B.1) sont des partenaires spécifiques des glutarédoxines ([138], [139], [140]).



**Figure 20 : Quelques partenaires des glutarédoxines et des thiorédoxines ou spécifiques.** D'après [36, 91], [136], [137], [138], [139], [140].

## 2. Grx et assemblage des centres Fe-S

Les glutarédoxines sont impliquées dans les processus de maturation et de stabilisation des centres [Fe-S].

Les protéines mitochondriales Isup1 et Isup2 jouent un rôle clé dans la maturation des protéines à centres [Fe-S] chez les eucaryotes. Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation de *grx5* (qui code pour une glutarédoxine à monothiol) provoque l'augmentation de la quantité de protéines à centre [Fe-S] liées à Isup1 [141]. Selon les auteurs, le processus de maturation se diviserait en deux étapes successives. Si Isup1 est directement impliquée dans la synthèse des centres [Fe-S], Grx5 serait impliquée dans une deuxième étape de dissociation et d'assemblage final des centres [Fe-S].

Un résultat similaire a été mis en évidence dans une autre étude [142]. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une influence de Grx5 sur le fonctionnement de la cystéine desulfurase (Nfs1). L'inactivation de *grx5* augmenterait, d'autre part, la concentration en fer dans la cellule ainsi que le dysfonctionnement d'enzymes utilisant un centre [Fe-S] pour leur activité [143].

Chez *E. coli*, le FNR (Fumarate nitrate réductase regulator), un senseur de l'oxygène, possède un centre [4Fe-4S] sous sa forme active (en anaérobiose). Ce centre disparaît en présence d'oxygène (O<sub>2</sub>). *In vitro*, l'addition de Grx1, Grx2 ou Grx3 augmente le temps de disparition (ou d'altération) du centre [4Fe-4S] tout en stimulant sa reconstitution. Cette activité n'est pas observée, dans les mêmes conditions expérimentales, en ajoutant Trx1 [144]. Cette étude confirme l'implication des glutarédoxines dans le processus de formation des centres [Fe-S].

Enfin, il existe un homologue de Grx5 chez le poisson zèbre (*Dario rerio*), qui possède une séquence et une fonction similaire. Son implication dans la synthèse des hèmes a été mise en évidence [145].

### 3. Glutarédoxines et catalyse de la déglutathionylation

Le mécanisme moléculaire de la glutathionylation a été décrit précédemment (voir Chapitre II partie I.B.3). Nous allons décrire dans cette partie les effets biologiques de cette réaction et ainsi que le mécanisme et les effets de la réaction inverse, dite de déglutathionylation, catalysée par les glutarédoxines.

**Le paradoxe de la glutathionylation.** La glutathionylation peut être considérée comme un des effets indirects du stress oxydant (car la proportion de glutathion oxydé (GSSG) augmente par rapport au glutathion réduit). Certaines voies cellulaires seraient alors bloquées. D'autres auteurs signalent à juste titre que la glutathionylation protégerait les cystéines réactives du stress oxydant et donc d'altérations qui seraient, elles, irréversibles [146] (voir Chapitre V).

Les réactions de glutathionylation/déglutathionylation ont donc des effets spécifiques sur chaque protéine. Des études au cas par cas sont indispensables. Nous pouvons toutefois faire l'hypothèse que les protéines glutathionylées impliquées dans les systèmes de contrôle de l'homéostasie des thiols sont déglutathionylées et donc activées en réponse à un stress oxydant (voir Chapitre V partie III). La réponse cellulaire en dépend.

L'étude réalisée par Kil *et col.* illustre ce paradoxe. Les auteurs ont montré que l'activité de l'isocitrate dehydrogenase NADP<sup>+</sup> dépendante mitochondriale (IDPm) est inhibée *in vitro* par glutathionylation, suite à un traitement oxydant. La réaction de déglutathionylation peut être catalysée par Grx2, en présence de glutathion réduit. Dans cette même étude, les auteurs ont toutefois remarqué que la forme glutathionylée de IDPm est moins sensible à la



fragmentation par les ERO et à la lyse protéolytique [147].

**La glutathionylation perturbe l'activité enzymatique.** Le premier effet décrit est l'inactivation de l'activité d'enzyme possédant des cystéines dans leur site actif, la glutathionylation bloquant la réactivité des groupements thiols. Ce phénomène a été récemment décrit par plusieurs auteurs dans des organismes variés. Ainsi la creatine kinase humaine (CK), source importante de synthèse d'ATP dans les myocytes (cellules musculaires cardiaques), est complètement inhibée par la glutathionylation de sa cystéine 283 [148, 149]. De même, la PAPS réductase d'*E. coli*, qui catalyse la réduction du sulfate inorganique ( $\text{SO}_4^{2-}$ , +VI) en sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ , +IV) perd son activité en présence de glutathion oxydé GSSG [33].

La position de la cystéine dans la séquence tridimensionnelle a une grande importance sur l'effet de la glutathionylation. Ainsi, l'activité de la protease de type 1 du HIV (Human Immunodeficiency Virus) est liée à sa dimérisation. Celle-ci peut être inhibée ou activée selon les résidus cystéines glutathionylés, qu'ils soient situés ou non dans les zones de dimérisation [150].

**Les glutarédoxines ont la propriété de catalyser la déglutathionylation.** Les glutarédoxines peuvent catalyser les réactions de déglutathionylation. Cette réaction entraîne la libération d'un groupement –GS– immédiatement pris en charge par les glutarédoxines (sous la forme Grx-SSG (Figure 21-1)). Cette propriété des glutarédoxines de prendre en charge les radicaux est basée sur leur faible pKa (environ 3,5) ainsi que sur la stabilité de la forme transitoire Grx-SSG. La glutarédoxine, à son tour glutathionylée, retourne à un état standard par réaction avec une molécule de glutathion réduit (GSH) (Figure 21-2). Seules les glutarédoxines ont la propriété de déglutathionyler les formes protéine-SSG, les thiorédoxines ne l'ont pas [151]. Le glutathion réduit (GSH) est indispensable à cette réaction.



**Figure 21 : Mécanisme catalytique de la déglutathionylation (ou déthiolation).** La cystéine réactive est représentée par le groupement thiol (–SH). GSSG : Glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit.

Les exemples précédemment cités (l'IDPm et la PAPS réductase), dont l'activité était affectée par glutathionylation, peuvent être réactivés par déglutathionylation [147], [33]. La réaction d'une glutarédoxine sur la forme glutathionylée de la PAPS réductase d'*E. coli* a été montrée *in vitro* sur des protéines purifiées [33]. La réversibilité de ces réactions est à nouveau confirmée.

Une étude suggère toutefois que les glutarédoxines catalyseraient la formation de formes protéiques glutathionylées. C'est le cas dans l'étude de Sarke *et al.* [152] où les auteurs démontrent ce type d'activité *in vitro* sur l'actine et la protéine-tyrosine phosphatase-1B humaines, partenaires des glutarédoxines. Les auteurs formulent l'hypothèse que les glutarédoxines seraient des vecteurs de transmission du signal (-SG, activateur) au sein de la cellule. Cependant, les tests ayant été réalisés *in vitro*, il se peut que les conditions thermodynamiques expérimentales ne soient pas les mêmes que celles observées *in vivo*. La réactivité des enzymes n'est peut être pas la même dans les cellules, notamment dans des conditions de stress. Nos propres résultats expérimentaux ne vont pas dans ce sens réactionnel.

#### 4. Expression des glutarédoxines et résistance au stress oxydant

Les glutarédoxines participent à la réponse cellulaire aux stress. Leur expression est induite en réponse à différents stress.

Les inductions transcriptionnelles des gènes codants pour les glutarédoxines en réponse à différents agents oxydants ont été mises en évidence chez *S. cerevisiae* [66] [153]. Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré que les systèmes thiorédoxine et glutarédoxine étaient induits en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de paraquat (PCRs quantitatives). Ils observaient également une induction du système glutarédoxine dans un mutant dépourvu de système thiorédoxine. Aucune étude similaire n'a été réalisée en réponse aux stress métalliques.

De même la réponse au cadmium (métal toxique) de *S. cerevisiae* a été observée aux niveaux transcriptomique et protéomique. L'implication des systèmes glutarédoxine et thiorédoxine a été mise en évidence [154].

D'autre part, le fait de surproduire une glutarédoxine entraîne une augmentation de résistance à l'apoptose provoquée par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en régulant l'état rédox de Akt (enzyme appartenant à la famille des sérine/thréonine kinases). Il est montré que cette propriété passe par la protection de Akt vis-à-vis de l'oxydation et par la suppression du recrutement de la phosphatase 2A (dephosphorylation de Akt), maintenant ainsi Akt sous sa forme phosphorylée, active [155].

## **Chapitre IV Le contrôle de l'homéostasie des thiols chez les organismes photosynthétiques**

Les deux voies de contrôle de l'homéostasie des thiols décrites chez les organismes non photosynthétiques sont présentes dans le cytoplasme des organismes photosynthétiques.

En revanche, les cellules photosynthétiques des organismes photosynthétiques supérieurs contiennent des chloroplastes, sièges de la photosynthèse (voir Chapitre II partie II.A), dont le système de contrôle de l'homéostasie des thiols est différent.

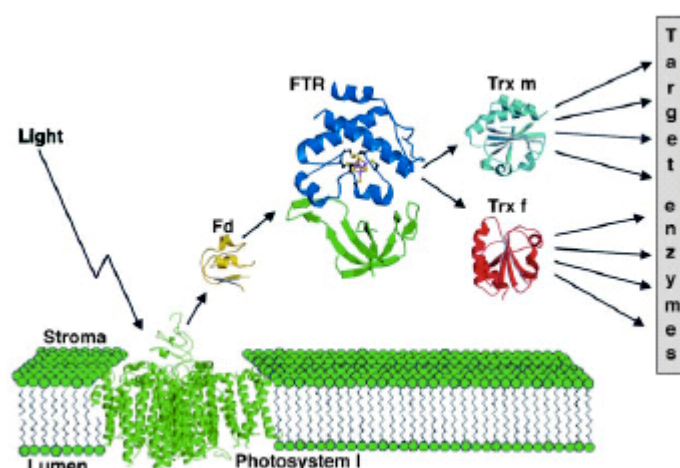
### **I. Le système de contrôle chloroplastique de l'homéostasie des thiols**

Les végétaux supérieurs possèdent des systèmes de contrôle redox cytosolique et mitochondrial, tout comme les organismes du règne animal (voir leur description Chapitre III partie I). Les chloroplastes ont la particularité d'utiliser les deux sources de pouvoir réducteur que sont le NADPH et les flux d'électrons issus de la photosynthèse.

Les deux systèmes thiorédoxine et glutarédoxine ont été identifiés dans les chloroplastes. Ces deux systèmes peuvent *a priori* être réduits par les électrons issus du NADPH et ceux issus de la photosynthèse.

**Le système thiorédoxine.** Les thiorédoxines de type *f*, *m* et *x* sont de type chloroplastique [156]. Ces thiorédoxines sont réduites via la voie photosynthétique. C'est-à-dire par les ferrédoxines et la ferrédoxine thiorédoxine réductase (FTR) qui utilisent le flux d'électrons issu du photosystème I (PSI) (voir Figure 22).

La transition entre un flux d'électrons et la réduction d'un site actif disulfure est réalisée par certaines protéines possédant les deux types de motifs : centre [Fe-S] et cystéines libres assurant la formation de ponts disulfures intermoléculaires. C'est le cas de la ferrédoxine thiorédoxine réductase (FTR), localisée dans les chloroplastes (mais aussi dans le cytoplasme des cyanobactéries voir Chapitre IV partie II). Cet enzyme clé assure le transfert de pouvoir réducteur entre des ferrédoxines (protéines à centre [Fe-S]) et des thiorédoxines (protéines à site actif disulfure). Il assure le transfert du pouvoir réducteur issu de la photosynthèse vers le métabolisme rédox général de la cellule [30].



**Figure 22 : Le système de réduction des thiorédoxines via la photosynthèse.** D'après [30], Fd :ferrédoxine, FTR : Ferrédoxine thiorédoxine réductase, Trx : thiorédoxine.

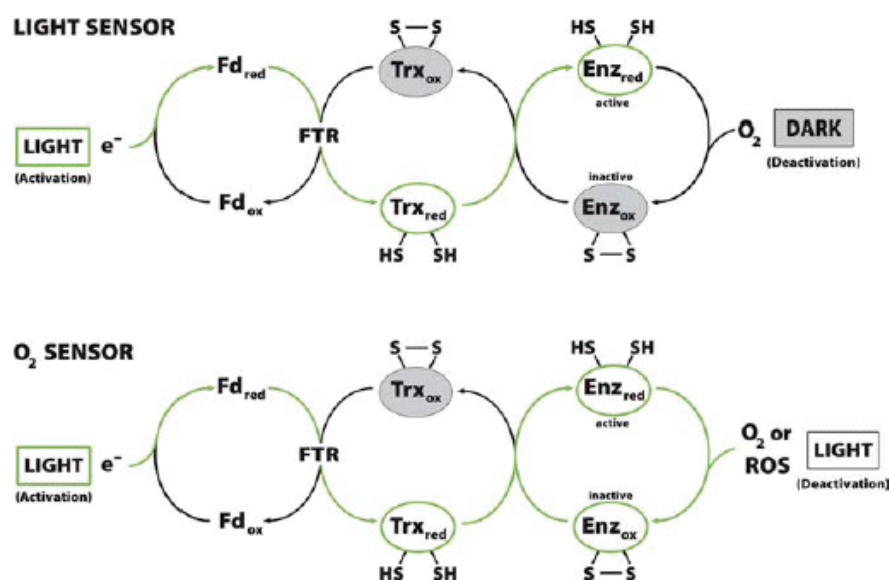
Récemment, une nouvelle thiorédoxine réductase (TR) chloroplastique a été découverte chez *A. thaliana*. Cette enzyme transfère aux thiorédoxines le pouvoir réducteur issu du NADPH. De façon tout à fait surprenante, cette enzyme est bi-fonctionnelle puisqu'elle possède aussi une activité thiorédoxine [157].

**Système glutarédoxine.** Chez le pois, il a été montré qu'une glutathion réductase dotée d'une séquence d'adressage cellulaire de 60 acides aminés était présente à la fois dans le chloroplaste et dans la mitochondrie. Ces séquences sont clivées par des systèmes

enzymatiques *ad hoc* au sein des organites [158].

Aucune étude portant sur des glutarédoxines chloroplastiques n'a été réalisée à ce jour, bien que leur existence ne fasse aucun doute. Les glutarédoxines que nous avons analysées au laboratoire leur sont très homologues. Les nouvelles voies rédox que nous avons caractérisées pourraient être également observées dans ces organites (voir Chapitre II et Chapitre III de la partie Résultats).

**Activité rédox et photosynthèse.** L'ensemble des expériences d'oxydoréduction liées à la photosynthèse sont directement sous le contrôle de l'énergie lumineuse, celle-ci active ou non de la photosynthèse (pour revue, voir[159]). De façon schématique, ces alternances dans les transmissions d'électrons liées à l'intensité lumineuse sont présentées dans la Figure 23.



**Figure 23 : Influence de l'intensité lumineuse sur le sens du transfert des électrons.** D'après [117], Fd : ferrédoxine, Trx : thiorédoxine, ROS : ou ERO, espèce réactive de l'oxygène.

## II. Le métabolisme rédox de *Synechocystis*

*Synechocystis* ne possède ni mitochondrie, ni chloroplaste. Cependant, son cytoplasme héberge les deux processus rédox de la respiration et de la photosynthèse.

Comme tous les organismes photosynthétiques, *Synechocystis* possède deux voies de transfert de pouvoir réducteur : 1) l'une utilise le flux d'électrons issu de la photosynthèse (localisée dans les thylakoïdes) impliquant les ferrédoxines et la ferrédoxine thiorédoxine

réductase (FTR), 2) l'autre, présente chez la plupart des êtres vivants utilise les électrons issus du NADPH et implique la thiorédoxine réductase et les systèmes thiorédoxine et glutarédoxine. Le système glutarédoxine de *Synechocystis* n'a jamais été analysé avant cette étude.

La glutathion réductase est absente de son génome (par recherche d'homologue à l'enzyme d'*E. coli*) (voir Chapitre III partie III.B). Cette absence pose la question de l'utilisation du glutathion dans ce microorganisme (dont le caractère facultatif a déjà été démontré chez *E. coli*, [90]). Cela pose aussi la question du fonctionnement des glutarédoxines, enzymes réduites par le glutathion cellulaire. Dans les études préalablement publiées sur les glutarédoxines, les auteurs ont beaucoup insisté sur les cibles de ces enzymes, peu sur leurs divers modes de réduction.

## Chapitre V: Le stress rédox, perturbation du métabolisme rédox

### I. La formation d'ERO

#### A. Définition

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) correspondent à différents états d'oxydation de l'oxygène. Il s'agit par ordre de réduction de l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), de l'ion peroxyde ( $O_2^{2-}$ ), présent naturellement dans les cellules sous la forme de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et du radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ).

Il existe différents agents chimiques générateurs de stress oxydant : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le ménadione, le tertbutyl, le paraquat et le bleu de méthylène génèrent différents types de ERO en réagissant avec les molécules d' $O_2$  (Figure 24).

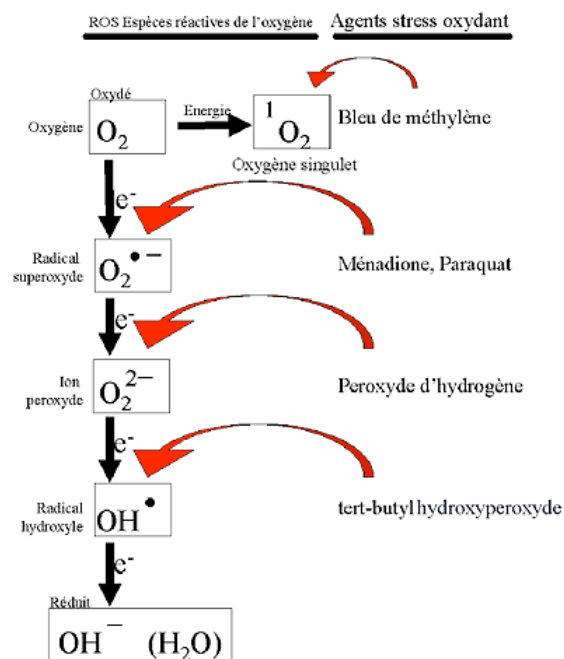


Figure 24 : Les différentes formes d'ERO générées par divers agents oxydants

La formation de l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) *in vivo* est principalement due au fonctionnement de la chaîne respiratoire chez les organismes aérobies [64]. Dans cette voie métabolique, l'oxygène est l'accepteur final des électrons. L'ion superoxyde peut être pris en charge par la



cellule pour générer du peroxyde d'hydrogène (réaction catalysée par la SOD, voir III.A).

## B. Excès des ERO et stress rédox

Les ERO sont naturellement produits dans les organismes vivants. Ils ont un rôle important dans plusieurs processus biologiques dont certaines voies de signalisation cellulaire [160]. Chez les mammifères, ils ont un rôle de messenger secondaire dans ces voies métaboliques en interaction avec des ligands spécifiques tels TGF-B1 ou l'endotheline [161], [162]. Les ERO sont aussi impliquées dans la modulation de l'activité de facteurs de transcription spécifiques tels que NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappaB) et AP-1 (Activator Protein-1) [163], [164]. Ainsi, NF- $\kappa$ B devient actif transcriptionnellement suite à la réaction des ERO avec I $\kappa$ B, son inhibiteur, le séquestrant dans le cytosol. Les ERO jouent donc un rôle majeur dans la modulation de l'inflammation.

Ces messagers cellulaires sont très réactifs mais aussi très instables. Des modifications fines de leur métabolisme ont donc des effets cellulaires importants.

Dans certaines conditions physiologiques, la production de ERO peut être augmentée et/ou la production d'antioxydants peut être diminuée. L'équilibre ERO/antioxydant est alors déplacé en faveur de ces premiers. La cellule se trouve dans un état qualifié de stress oxydant [165].

La toxicité cellulaire des ERO n'est pas encore clairement explicitée. Une des hypothèses émises suppose que les ERO sont pris en charge par les différents systèmes antioxydants cellulaires. Lorsque ces systèmes sont dépassés par la quantité d'ERO, ceux-ci réagissent directement avec les constituants de la cellule que sont l'ADN, les lipides et les protéines, causant des altérations voire la mort des cellules [166], [167].

**Altération de l'ADN.** Le support de l'information génétique, l'ADN, est localisé soit dans un noyau (organismes eucaryotes) soit dans le cytoplasme (organismes procaryotes). Chez ces derniers, l'ADN est directement exposé aux différents métabolites présents dans le cytoplasme.

Les ERO sont une cause majeure d'altération de l'ADN. Elles provoquent des cassures des brins d'ADN, des modifications des bases organiques des nucléotides voire l'excision possible de certains nucléotides. Bien que les cellules possèdent des systèmes de réparation permettant le maintien de l'intégrité de l'ADN, les ERO provoquent une augmentation de la fréquence de mutation telle que certaines d'entre elles ne peuvent être réparées. Ainsi, des

lymphocytes T mis en présence de peroxyde d'hydrogène voient leur fréquence de mutation augmenter[168]. Les localisations de ces mutations sont aléatoires, leurs conséquences physiologiques ne sont pas prévisibles (au sein d'une phase codante, dans une zone régulatrice, ...).

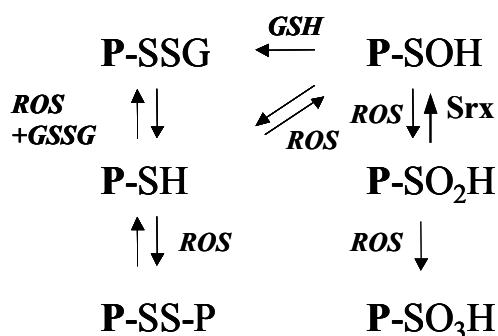
En affectant directement le support de l'information génétique, les ERO peuvent provoquer des perturbations dans le cycle de division cellulaire. Ces perturbations entraînent dans les cas les plus sévères l'apoptose de la cellule [169].

Chez *S. cerevisiae*, le système de réparation de l'ADN implique entre autres Tsa1 (peroxirédoxine). Cette protéine est fréquemment impliquée dans des processus de résistance au stress oxydant. L'absence de cette enzyme entraîne une augmentation du taux de mutations, de recombinaisons et de réarrangement chromosomique [170].

Une autre forme d'altération provoquée par les ERO est l'oxydation de certaines familles de protéines.

**Oxydation des protéines.** Les protéines sont composées de vingt acides aminés différents. Les ERO ne réagissent pas avec l'ensemble. Parmi ces acides aminés, les cystéines, les méthionines et les histidines sont décrites comme étant particulièrement soumises à l'oxydation en leur présence, notamment en présence du radical hydroxyl. Les propriétés antioxydantes de la méthionine et de l'histidine sont connues, les mécanismes moléculaires de leurs interactions avec les ERO ne sont cependant pas décrites [171], [172]. Les cystéines ont aussi la capacité d'interagir avec les ERO.

Les réactions entre les groupements thiols des cystéines et les ERO sont présentées en Figure 25. Ces réactions peuvent conduire à la formation de formes glutathionylées des protéines [173], [174]. Elles peuvent aussi conduire à la formation de modifications irréversibles.



**Figure 25 : Effet des ERO sur l'état redox des cystéines.** Forme réduite (PSH), forme glutathionylée (P-SSG), forme acide sulfénique (PSOH), forme acide sulfinique (PSO<sub>2</sub>H) et forme acide sulfonique (PSO<sub>3</sub>H), glutathion réduit (GSH), glutathion oxydé (GSSG) et espèces réactives de l'oxygène (ERO), Sulphirédoxine (Srx)

La forme réduite de la protéine (PSH) peut réagir directement avec le glutathion oxydé (GSSG) dont l'abondance par rapport au glutathion réduit (GSH) est favorisée par les ERO dans la cellule.

La protéine réduite (PSH) peut aussi être initialement « activée » par des ERO sous la forme d'un radical thyl (PS-) ou sous la forme d'un acide sulfénique (PSOH). Ces modifications peuvent être stabilisées ou réagir avec le GSH pour donner une protéine glutathionylée.

Toutes ces réactions sont réversibles et la proportion respective des différentes formes est dépendante des ERO. Il faut noter que la forme acide sulfénique (PSOH) de la protéine peut encore être oxydée pour donner une forme acide sulfinique (PSO<sub>2</sub>H) puis une forme acide sulfonique (PSO<sub>3</sub>H). Cette dernière réaction est irréversible [175]. Les protéines contenant un acide sulfinique peuvent être réduites via une nouvelle protéine récemment découverte, la sulphirédoxine [176].

Par extension, les protéines possédant ces acides aminés sont particulièrement sensibles à l'oxydation, d'autant plus lorsque ces acides aminés ont un rôle clé dans le fonctionnement catalytique de ces enzymes (site actif, site de liaison à un co-facteur, site d'interaction avec un partenaire). Les protéines soumises aux ERO voient leur structure tridimensionnelle modifiée, peuvent être soumises à l'agrégation ou à la fragmentation [147]. Ces modifications les rendent finalement sensibles à la dégradation par les systèmes cellulaires chargés de l'élimination des protéines altérées (protéases, etc...).

**Peroxydation des lipides.** Les acides gras polyinsaturés possèdent des doubles liaisons carbone-carbone très réactives avec les ERO. Un seul radical hydroxyle peut entraîner la peroxydation de plusieurs acides gras polyinsaturés, ces réactions s'auto-entretiennent dans un cycle de réactions en chaîne.

Outre la dégradation des membranes, les ERO génèrent, par réactions avec les acides gras, des composés secondaires appelés hydroperoxydes lipidiques (RO-OH). Les hydroperoxydes lipidiques peuvent à leur tour réagir avec les protéines et l'ADN [177].

Les sources de production des ERO entraînant ces affectations cellulaires sont nombreuses. D'un point de vue physique, les ERO peuvent être produits par une excitation exogène générée par des radiations ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou UV) [178]. D'un point de vue chimique, les ERO peuvent être produits par des agents réactifs, possédant des couches électroniques périphériques instables. Nous nous attacherons à démontrer comment les agents oxydants (en détaillant l'exemple du peroxyde d'hydrogène) et les oxydes de métaux (en détaillant l'exemple du sélénium) sont générateurs de ERO et donc de stress oxydant. D'autres composés chimiques générateurs de stress oxydant, comme les alcools, les aromatiques [179] ou encore les pesticides [180], ne seront pas abordés dans cette étude.

Les glutathion peroxydases sont des enzymes impliquées dans la tolérance au stress oxydant. Elles participent à la réparation des lipides hydroxylés par le  $H_2O_2$  ou le tert-butyl [181], [182].

## II. Agents oxydants et métaux produisent des ERO

### A. Agents oxydants et stress oxydant

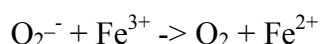
Les agents oxydants connus sont le peroxyde d'hydrogène, la ménadione, le paraquat et le tert-butyl, l'hydroxyperoxyde. Ces différents agents produisent des ERO spécifiques (Figure 24) et ne pénètrent pas tous de la même façon dans les tissus.

Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est très soluble mais peu réactif. Cette propriété lui permet de diffuser largement dans la cellule et d'atteindre un spectre de cibles très large. Sa réactivité se traduit par une oxydation au niveau des résidus soufrés, cystéine et méthionine, des protéines [183]. L'oxydation d'une cystéine par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  entraîne la formation d'un acide sulfénique (SOH). Cette espèce peut ensuite s'oxyder en acide sulfinique ( $\text{SO}_2\text{H}$ ) ou sulfonique ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) ou réagir avec une autre cystéine pour former un pont disulfure (Figure 25).

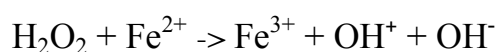
L'oxydation d'un résidu méthionine par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  conduit à la formation de méthionine-sulfoxyde, dont la réduction est catalysée par une enzyme spécifique, la méthionine-sulfoxyde réductase [184], [185].

L'ion hydroxyle ( $\text{OH}^-$ ) est produit à partir de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par respectivement les réactions d'Haber Weiss et de Fenton (voir Figure 26).

#### Réaction d'Haber-Weiss



#### Réaction de Fenton



**Figure 26 : L'ion hydroxyle est produit à partir de l'ion superoxyde (ou du peroxyde d'hydrogène).** Ces réactions impliquent la présence de fer ou de cuivre.

Ces réactions mettent clairement en évidence l'influence que peuvent avoir certains métaux biologiques, libres dans la cellule, (ici des métaux de transition : Fe et Cu) dans la production intracellulaire d'ERO.

## B. Métaux et stress métalliques

### 1. Mécanismes généraux

La notion même de stress métallique est débattue dans la littérature. Si la toxicité des métaux et en particulier des métaux lourds est mise en évidence au niveau physiologique, les mécanismes moléculaires impliqués restent largement méconnus. D'autre part, il faut distinguer la toxicité propre à chaque métal de la toxicité induite due à sa charge électronique (et commune à tous les éléments métalliques), voire de la toxicité radiative de certains d'entre eux. C'est le cas, par exemple, des métaux appartenant à la famille des actinides, comprenant des isotopes radioactifs, dont la présence est délétère pour les organismes vivants, générant notamment des cassures dans l'ADN [186]. Je ne traiterai pas de cette dernière toxicité dans cette étude.

Les métaux sont toxiques sous leur forme oxydée, soluble et le sont moins, voire pas, sous leur forme réduite car insoluble (donc moins biodisponible).

D'un point de vue physiologique, il est possible de séparer les métaux en deux familles. D'une part, on parle de métaux biologiques lorsque ceux-ci sont naturellement présents et participent au bon fonctionnement cellulaire des organismes (fer (Fe), zinc (Zn), cuivre (Cu), sélénium (Se), etc...), par exemple en tant que co-facteur des métalloprotéines. D'autre part, on parle de métaux abiotiques ou lourds lorsque ceux-ci ne sont connus que pour leur effet toxique (uranium(U), arsenic (As), cadmium (Cd), etc...).

La toxicité ainsi que la réponse cellulaire à certains métaux comme le mercure, l'arsenate ou encore le cadmium ont été étudiées, mais les mécanismes globaux de la réponse cellulaire ne sont pas connus (pour revue, voir respectivement [187], [188], [189] et [190]). Au contraire des métaux biologiques, la seule présence des métaux abiotiques ou lourds dans les organismes vivants peut perturber leur métabolisme et provoquer un stress rédox (stress métallique) en déplaçant les équilibres électroniques intracellulaires [191]. La réponse globale de *Synechocystis* au cadmium a été analysée au laboratoire (voir Article I Houot et col.).

Si la présence des métaux biologiques est indispensable à la viabilité cellulaire (oligoéléments), leur toxicité apparaît au delà d'une certaine dose. Notre étude se focalisera sur l'étude de la toxicité chimique du sélénium.

## 2. Toxicité propre des métaux : l'exemple du sélénium

**Généralités.** Jusqu'ici nous avons considéré la toxicité des métaux uniquement par le biais de la production d'ERO qu'ils génèrent [192]. Toutefois, il faut aussi considérer les métaux comme des espèces réactives propres pouvant interagir avec les différents composés cellulaires. En effet, tout comme les ERO qu'ils peuvent générer, les métaux ont la capacité d'échanger des électrons. Leur encombrement stérique, leur degré d'oxydation ou leur état physico-chimique (ion, oxyde ou précipité) sont autant de paramètres influant sur leur réactivité.

Le sélénium peut remplacer des atomes de soufre dans certaines protéines [193]. Cette substitution est basée sur la similarité tant stérique qu'électronique entre les deux atomes [194]. Dans certains cas, la structure tridimensionnelle des protéines considérées peut être modifiée et leur fonctionnement perturbé [195]. L'uranium ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) et le césium ( $\text{Cs}^+$ ) peuvent se substituer au manganèse et se lier au complexe d'oxydation de l'eau du photosystème II, tout en perturbant son fonctionnement [196].

Nous illustrerons et détaillerons la toxicité du sélénium, qui a la particularité d'être un métal biologique et peut exister sous deux formes oxydées différentes le sélénite ( $\text{SeO}_3$ ) et le sélénate ( $\text{SeO}_4$ ).

**Caractéristiques physico-chimiques du sélénium.** Le sélénium ( $Z=34$ ) est un élément qui possède des propriétés chimiques et physiques semblables à celles du soufre, tout en ayant un caractère plus métallique. Il se présente sous différentes formes allotropiques, la plus stable étant le sélénium élémentaire, de couleur rouge et de structure cristalline. Le sélénium se trouve dans la nature le plus souvent associé à certains minerais sulfurés du fer, du plomb et du cuivre, notamment. Dans ses composés, le sélénium peut prendre les états d'oxydation + II, + IV et + VI. Les deux oxydes principaux sont le sélénite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ , + IV) et le sélénate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ , + VI).

**Rôle biologique.** Le sélénium est incorporé de façon naturelle au sein de certaines protéines appelées sélénoprotéines, sous la forme de sélénocystéines [197] [198]. Ces résidus sont des cystéines dont l'atome de soufre a été substitué par un atome de sélénium. Les sélénoprotéines ont des propriétés oxydoréductrices basées sur les différents états redox du sélénium et sont impliquées dans des voies métaboliques de peroxydation [199], de réduction impliquant des thiols et de réduction du cytochrome c [200, 201]. Les exemples de

sélénoprotéines sont nombreux, nous citerons la phospholipide hydroperoxide glutathion peroxidase (PHGPx) de mammifères [202], la thiorédoxine glutathion réductase humaine [203] ou encore la methionine sulfoxide réductases (MrsB) [204].

La voie métabolique conduisant à l'incorporation du sélénium dans ces protéines a été identifiée chez *E. coli*. Elle implique 4 gènes : *selA*, *selB*, *selC* et *selD*. *SelA* code pour une selenocystéine synthase capable de convertir un ARNt apparié à une sérine en selenocysteyl-ARNt [205, 206]. L'expression de *selC* entraîne la production d'un selenocysteyl-ARNt qui peut s'apparier au codon UGA et à une selenocystéine [207]. *selD* code pour une selenophosphate synthase permettant la synthèse de selenophosphate, forme utilisable pour l'incorporation protéique à partir du sélénium élémentaire [208], [209]. Enfin *selB* code pour un facteur d'élongation permettant la bonne intégration des sélénocystéines lors de la synthèse [210].

Le sélénium joue un rôle protecteur vis-à-vis des rayonnements ultraviolet (UV) et des radiations ionisantes [211], [212], [213]. Ces différentes études ne permettent toutefois pas de comprendre le mécanisme moléculaire de protection impliquant le sélénium. Nous pouvons toutefois supposer que le sélénium pourrait réagir directement avec ces rayons, préservant ainsi les éléments cellulaires.

Des études métaboliques réalisées chez des mammifères mettent aussi en évidence le rôle protecteur du sélénium vis-à-vis de la toxicité du cuivre et du cadmium [214] [215]. Ces deux études corrélaient clairement l'absence de sélénium dans l'alimentation et la plus grande sensibilité des mammifères à la toxicité du cuivre et du cadmium.

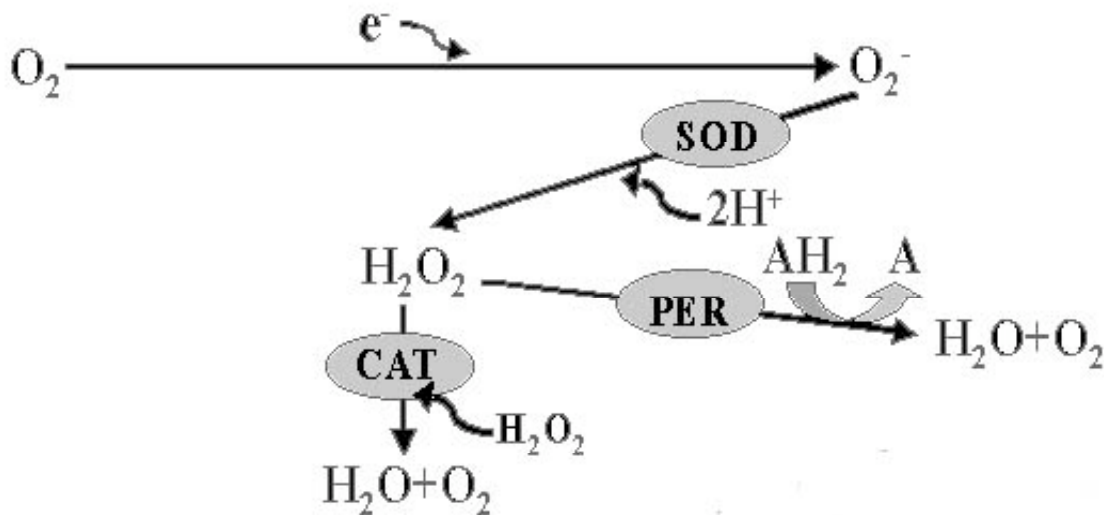
**Toxicité chimique.** Si le sélénium est un oligo-élément indispensable à la viabilité cellulaire, en excès, il peut être très toxique [216], [217]. Le sélénium régule l'activité d'un grand nombre de protéines en modifiant leur état redox. Particulièrement, le sélénium est capable d'oxyder les résidus cystéine de certaines enzymes (par exemple celles de la protéine kinase C [218]). D'autre part, le sélénite inhibe l'activité d'une caspase humaine [219], d'une Na,K ATPase [220] ou du facteur de transcription NF- $\kappa$ B [221].



### III. Les effecteurs de la réponse au stress rédox

#### A. Prise en charge du stress oxydant

La concentration en peroxyde d'hydrogène est contrôlée grâce à deux types d'activités reposant sur deux modes de catalyse différents (Figure 27).



**Figure 27 : Rôle de la catalase (CAT) et de la peroxydase (PER) dans la prise en charge du peroxyde d'hydrogène**

1) Les superoxyde dismutases et les catalases catalysent respectivement la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau grâce aux propriétés rédox des métaux. L'activité réductrice de ces deux enzymes ne dépend pas du pouvoir réducteur du NADH ou du NADPH. 2) Les peroxydases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et des peroxydes organiques en leur alcool correspondant grâce au pouvoir réducteur du NADPH (ou du NADH). L'activité de ces enzymes repose sur la présence de thiols ou de sélénothiols réactifs.

L'activité superoxyde-dismutase (SOD) est retrouvée chez la plupart des organismes aérobies. Elle catalyse la conversion de deux molécules d' $O_2$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$  par un mécanisme de dismutation métal-dépendant. Il existe trois types de SOD, en fonction de la nature du métal de transition impliqué : les superoxyde-dismutases Fer-dépendantes, (Fe-SOD), les superoxyde-dismutases Manganèse-dépendantes, (Mn-SOD) et les superoxyde-dismutases Cuivre-dépendantes, (Cu/Zn-SOD), le zinc jouant dans ce cas un rôle structural.

Chez *E. coli*, comme chez *S. cerevisiae*, l'absence d'activité SOD entraîne un défaut de croissance en conditions aérobies, diverses auxotrophies en milieu minimum, une hypersensibilité à l'oxygène et aux agents générateurs d'ions superoxyde, ainsi qu'une augmentation du taux de mutations spontanées [222], [223]. Une partie de ces phénotypes est imputée à l'inactivation par l'ion superoxyde des protéines à centres Fer-Soufre, dont certaines participent aux voies de biosynthèse des acides aminés [224]. Les superoxyde-dismutases permettent donc de prévenir la toxicité associée à la présence d'ions superoxyde. Ce-faisant, elles participent à la production d'un autre composé potentiellement toxique, le peroxyde d'hydrogène. D'autres activités, les catalases et les peroxydases sont alors mises en jeu.

Les catalases sont des protéines homotétramériques, dont l'activité catalytique repose sur la présence d'un hème. Les catalases réduisent par dismutation deux molécules d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et O<sub>2</sub> en utilisant le pouvoir catalytique du fer. La catalase a été l'une des premières enzymes décrites chez la bactérie *E. coli*, qui possède deux types de catalases codées par les gènes KatE [225] et KatG [226].

Les thiol-peroxydases (PER) sont de petites protéines catalysant la réduction à un électron des peroxydes (ROOH). Le site catalytique des thiol-peroxydases est constitué d'une cystéine réactive, capable de réaliser une attaque nucléophile de la fonction peroxyde. Cette réaction entraîne de façon concomitante la libération d'une molécule d'eau ou d'alcool et la formation d'un acide sulfénique (Cys-OH) au niveau du site catalytique [227].

## B. Prise en charge du stress métallique

### 1. La réductase de l'arsenate (ArsC)

La réductase de l'arsenate (arsenate réductase, ArsC) catalyse la réduction de l'arsenate ( $\text{HAsO}_4^{2-}$ , V) en arsenite ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ , III) et participe donc aux systèmes de détoxification de l'arsenic chez les procaryotes et les eucaryotes [228], [229], [140]. Cette enzyme est ubiquiste dans le règne vivant. Chez les bactéries, le gène codant pour l'arsenate réductase est très souvent associé en opéron à d'autres enzymes intervenant dans le processus de détoxification de l'arsenate et de l'arsenite. Celles-ci sont impliquées dans la résistance (ArsH, ArsB), le transport (ArsA) ou la régulation de l'expression (ArsR, activateur). Chez *Staphylococcus aureus*, ArsC est présente sur un plasmide (pI258) conférant la résistance à l'arsenate et à l'arsenite. Ce plasmide contient aussi un gène codant pour une protéine de régulation (ArsR) et un gène codant pour une protéine impliquée dans l'export de l'arsenite (ArsA) [230] (pour revue [231]).

Les différentes formes d'ArsC provenant de différents organismes n'ont pas forcément de fortes homologues entre elles, les séquences ne sont pas conservées. Chez les procaryotes, on peut néanmoins les séparer en deux grandes familles (Tableau 2).

Organismes	Gram+ : Exemple pI258 ArsC ( <i>S. aureus</i> )	Gram- : Exemple R773 ArsC ( <i>E. coli</i> )
Site actif	CX5C, boucle P	HX3CX3R
Mode de réduction	Thiorédoxine réductase + Trx [232]	GSH + Grx [233]

**Tableau 2 : Il existe deux familles d'ArsC chez les procaryotes.**

- Les ArsC de la première famille possèdent en plus de la fonction arsenate réductase une fonction de tyrosine phosphatase (et un repliement caractéristique identique) [234]. Leur site actif est de type disulfure (voir I.B.3). Il est impliqué dans la fonction arsenate réductase en partenariat avec une cystéine située en dehors du site actif. Elles sont présentes chez les bactéries Gram+ (exemple *S. aureus*) et sont réduites par la voie des thiorédoxines [232] (Tableau 2).
- Les ArsC de la deuxième famille ne possèdent *a priori* qu'une activité de réduction de

l'arsenate. Leur site actif est très conservé et la séquence consensus est HX3CX3R. Leur structure a été résolue sur ArsC de *Pseudomonas aeruginosa* [235]. Elles sont présentes chez les bactéries Gram- (exemple *E. coli*) et sont réduites par la voie des glutarédoxines [233]. Leur structure suggère la présence d'un site de liaison au glutathion. Le site actif ne contient qu'une seule cystéine et formerait un mélange disulfure mixte avec une molécule de glutathion avant sa régénération par les glutarédoxines (Tableau 2).

Chez les eucaryotes, les études ont été essentiellement réalisées chez la levure (*S. cerevisiae*), l'enzyme portant la fonction arsenate réductase est Acr2P (Tableau 3). Cette protéine a un homologue chez l'homme, elle appartient à la famille des phosphotyrosyl phosphatase (Cdc25A). Acr2p possède un site actif conservé chez ses orthologues dont la séquence consensus est HCX5R et il a été montré que Arc2P est réduite par la voie des glutarédoxines [140]. Le rôle biologique de cette famille d'enzymes possédant une fonction de phosphatase est encore à découvrir.

<b>Organisme</b>	<i>S. cerevisiae</i>
<b>Site actif</b>	HCX5R
<b>Mode de réduction</b>	GSH + Grx [140]

**Tableau 3 : Une seule famille d'ArsC a été identifiée chez les eucaryotes [140].**

Chez *Synechocystis*, trois gènes codant pour des réductases de l'arsenate sont présents : l'un est présent sur le chromosome (*slr0946*) et 2 autres sont présents sur les plasmides pSYSM et pSYSX (respectivement *sll5104* et *slr6037*). Les deux réductases de l'arsenate codées par les gènes plasmidiques sont faiblement homologues à la réductase de l'arsenate codée par le gène chromosomique. Par contre elles ont une séquence strictement identique (*Sll5104* possédant 4 acides aminés (MTEN) supplémentaires en N-terminal). Les propriétés structurales de ces trois réductases sont présentées dans le Tableau 4.

La réductase chromosomique de l'arsenate (ArsC) possède un site actif de type CX4C (similaire à un site CX5C). Les deux réductases de l'arsenate codées par les plasmides ont un site actif de type HX3CX3R et leur mode de réduction est inconnu.

Organisme	<i>Synechocystis</i>		
Gène :	<i>slr0946</i> :	<i>sll5104</i> :	<i>slr6037</i> :
Localisation	chromosomique	plasmidique	plasmidique
Site actif	CX4R	HX3CX3R	HX3CX3R
Mode de réduction	GSH + Grx [236]	?	?

**Tableau 4 : *Synechocystis* possède 3 réductases de l'arsenate.**

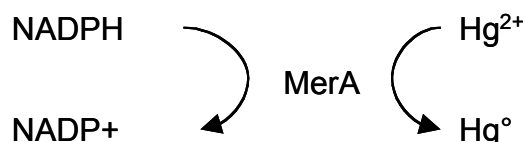
Les réductases de l'arsenate codées par les plasmides (*Sll5104* et *Slr6037*) ont été identifiées suite au séquençage récent des plasmides de *Synechocystis*. Aucune étude n'a été encore réalisée sur ces protéines.

## 2. La réductase du mercure

**Famille des pyridine-nucleotide disulfide oxydoréductases.** La découverte de la réductase du mercure (ou mercuric reductase, MerA) a été réalisée chez *E. coli* en 1978 par Schottel. Elle a identifiée et purifiée l'enzyme, organisée en homodimer, responsable de la réduction du mercure ( $Hg^{2+}$ ) en mercure élémentaire ( $Hg^0$ ) en présence de NADPH [237]. La réductase du mercure de *Pseudomonas aeruginosa* a ensuite été purifiée et son potentiel mesuré à -269mV [238].

MerA appartient à la famille des pyridine-nucleotide disulfide oxydoréductases. De nombreuses études structurales ont permis d'affiner la compréhension du fonctionnement du site catalytique, la première d'entre elles a été obtenue chez *Bacillus subtilis* [239]. Ce sont

des flavoprotéines à FAD (Flavin Adénine Dinucléotide, voir I.B.1) dont la séquence consensus de liaison est IYSAGD. Elles possèdent en outre un site actif disulfure (CX<sub>n</sub>C, voir I.B.3). Ces deux éléments fonctionnels sont situés à proximité dans l'espace. Après réaction avec le substrat, le site actif est réduit par le FAD (réduction intramoléculaire) qui est lui-même réduit par le NADPH cellulaire (Figure 28).



**Figure 28 : MerA réduit l'ion Hg<sup>2+</sup> en mercure élémentaire (Hg<sup>0</sup>) en utilisant directement le pouvoir réducteur du NADPH [238].**

La réductase du mercure est capable de réduire l'ion mercure (Hg<sup>2+</sup>) en mercure élémentaire Hg<sup>0</sup> en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH, via son co-facteur FAD.

Elle appartient à une grande famille qui contient la dihydrolipoamide deshydrogenase (impliquée dans la catalyse de la réduction de lipoamide en dihydrolipoamide), la trypanothione réductase (enzyme clé du métabolisme rédox de certains parasites protozoaires, catalyse de la réduction de la glutathionylspermidine [240]), la thiorédoxine réductase (réduction des Thiorédoxines) ou la glutathion réductase (réduction du glutathion).

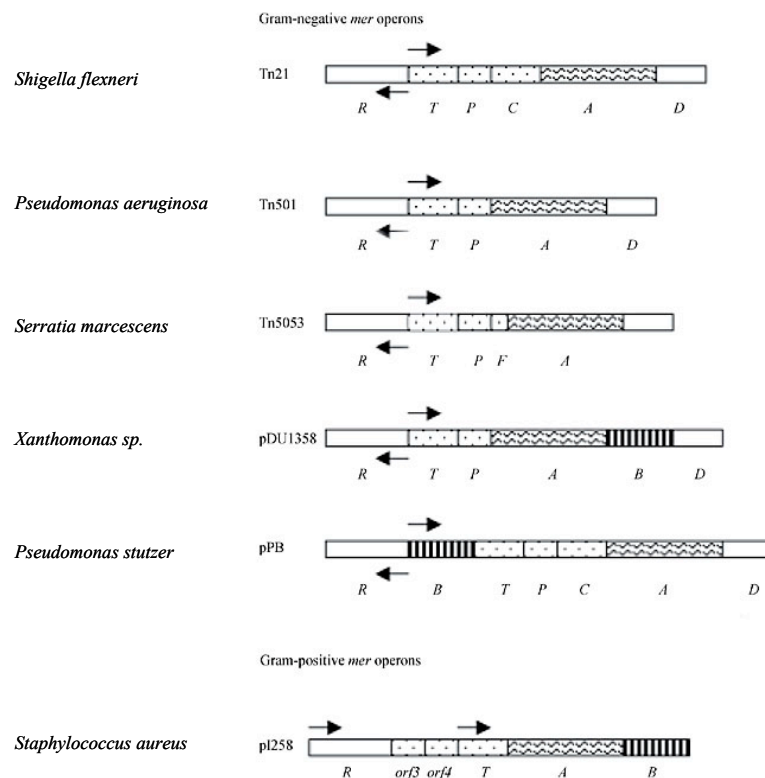
**L'opéron Mer.** Par la suite, ce sont des systèmes opéroniques de résistance au mercure qui ont été identifiés chez des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. Cet opéron est appelé de façon générique l'opéron Mer. Ces opérons ont été trouvés chez différents microorganismes dont *Pseudomonas*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [241], [242], [243],

Ils sont composés des enzymes suivantes

- MerT et MerP (localisé dans le périplasme) impliquées dans le transport du mercure [244],
- MerD, dont l'implication est mise en évidence mais la fonction n'est pas connue,
- MerB (organomercurial ligase) catalyse le clivage des liaisons carbone-mercure. Il permet la libération d'ions Hg<sup>2+</sup> (lorsque celui-ci est sous la forme méthylmercure) qui est réduit par MerA [245]. De travaux récents suggèrent un transfert direct de l'ion de merB à merA [246],

- MerR est le régulateur transcriptionnel de l'opéron Mer,
- MerG, MerF, MerC ont des fonctions inconnues.

Cependant, derrière le terme d'opéron Mer se cache une grande diversité d'associations géniques (Figure 29, d'après [247]).



**Figure 29 : L'opéron Mer est présent sous des combinaisons géniques variables.** Les opérons Mer de différents procaryotes (Gram+ et Gram-) sont représentés. Tous ces opérons sont présents sur des plasmides [247].

En effet ces opérons sont plus ou moins complets. Ils sont la plupart du temps localisés sur des plasmides [248] mais peuvent aussi être présents sur le chromosome [249].

Chez *Synechocystis*, l'opéron Mer n'est que partiellement présent. Outre MerA (Slr1849), aucune autre enzyme de l'opéron n'est identifiée comme telle dans le génome (CYANOBASE). Des enzymes orthologues à certaines d'entre elles ont toutefois été trouvées (voir

Tableau 5).

Opéron Mer ( <i>E. coli</i> )	Orthologues possibles chez <i>Synechocystis</i>	e value	% identité	% homologie
<b>MerA</b>	MerA (Slr1849)	3e-26	35	51
<b>MerR</b>	Transcriptional regulator (Slr0701)	2e-13	30	54
	Cobalt-responsive regulator CoaR (Slr00794)	1e-05	34	50
<b>MerD</b>	Cobalt-responsive regulator CoaR (Slr0794)	2 e-04	30	43
<b>MerP</b>	Copper transporting CPx-type ATPase (PacS) (Slr1920)	5e-10	42	62
	Copper-transporting CPx-type ATPase (ctaA) (Slr1950)	9e-07	29	52
	Zinc exporter ZiaA (Slr0798)	9e-05	26	52
	Mercuric transport protein periplasmic component precursor (Ssr2857)	2e-03	28	47

**Tableau 5 : Orthologues possibles des membres de l'opéron Mer d'*E. coli* chez *Synechocystis***

Ainsi, les orthologues possibles aux enzymes de l'opéron Mer identifiées chez *E. coli* ont de très bonnes homologies avec des enzymes de *Synechocystis*. Cependant, ces orthologues ne sont pas organisées en opéron. Mais nous remarquons que ces protéines sont toutes identifiées comme impliquées dans la réponse cellulaire à différents métaux (cobalt, cuivre, zinc). Nous pouvons donc supposer qu'une intégration des réponses cellulaires à différents stress métalliques est envisageable.

### 3. La définition des réductases métaux

Rechercher la définition d'une réductase métal revient nécessairement à se demander si cette appellation n'est pas empreinte de finalisme. Si sa fonction de réduction de certains métaux ne semble pas être à redémontrer, son caractère ubiquiste interroge. D'un point de vue évolutionniste, il semble tout à fait intéressant que des gènes codant pour des protéines de réduction d'éléments abiotiques que l'on ne trouve que dans certains endroits du globe soient



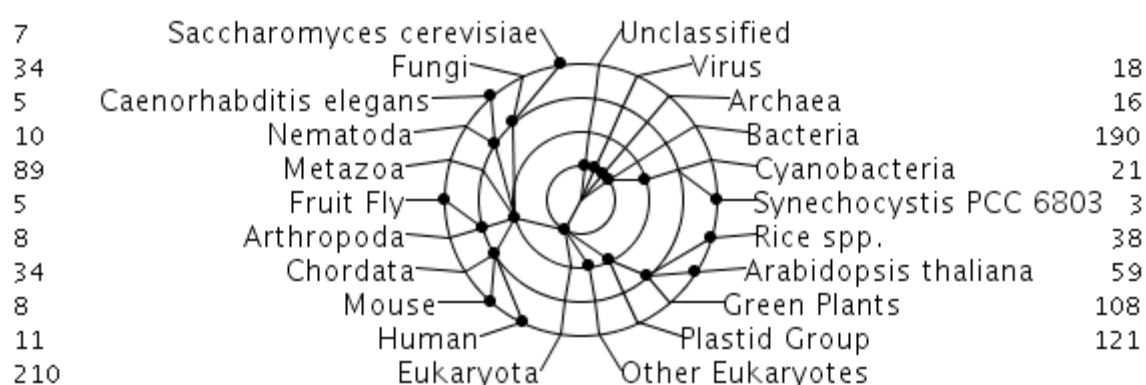
aussi largement répandus dans les génomes. D'autant que ces gènes ne sont pas essentiels à la viabilité cellulaire.

Ainsi, la réductase de l'arsenate de *S. aureus*, outre sa fonction de réduction de l'arsenate, possède aussi une activité tyrosine phosphatase [234]. Cette fonction intègre *in fine* cette enzyme dans le fonctionnement physiologique de cet organisme.

# RESULTATS

## Chapitre I Mise en évidence de la sélectivité des glutarédoxines de *Synechocystis*

I. La séquence du génome de *Synechocystis* prédit l'existence de trois glutarédoxines



**Figure 30 : Arbre phylogénétique des glutarédoxines.** D'après CYANOBASE (<http://www.kazusa.or.jp>). Les nombres totaux de glutarédoxines sont figurés pour chaque catégorie représentée.

Cet arbre phylogénétique (Figure 1), basé (de proche en proche) sur les homologies de séquences des différentes séquences de glutarédoxines, montre que ces protéines sont présentes chez l'ensemble des organismes modèles, ce qui indique l'importance des glutarédoxines pour la physiologie cellulaire.

Si cet arbre donne une information évolutive, il ne renseigne pas sur la conservation des éléments fonctionnels des glutarédoxines. Pour comparer les séquences de leur site actif et de leur site de fixation du glutathion plus finement, j'ai réalisé des alignements de séquences primaires des glutarédoxines de *Synechocystis* avec leurs homologues présents dans divers organismes modèles.

**Grx1**

**Grx1 *Synechocystis*** MANLFWLPLLSGRQADGIKAKVEIYTWQTCPFCIRAKLLLWVKGVKFIYKIDGDDQARQAM  
 Grx1 *Anabaena* PCC 7120 MSNLFN---QLFGRSPAKIKANVEIYTWQTCPYCIIRAKLLLWVKGVQFTEYKIDGDEAARANM  
 Grx1 *A. Variabilis* ATCC 29413 MLNLFN---QFFGRSPEKIKANVEIYTWQTCPYCIIRAKLLLWVKGVQFTEYKIDGDEAARANM  
 Grx1 *C. watsonii* WH 8501 MLNLFN---SLGRDPQKIKADVEIYTWQTCPFCIRAKLLLWVKGVNFTYKIDGDEETAREKM  
 Grx1 *T. erythraeum* IMS 10166 MLDLFN--PIL--GRHPERMKAKVEIYTWQTCPYCIIRAKLLLWVKGVNYTEYKIDGNESARNSM  
 Grx1 *N. punctiforme* PCC 73102 MLDLFN--PLL--NRHPERVKANVELYTWQTCPYCIIRAKLLLWVKGVNFTYKIDGDEGARAKM

**Grx1 *Synechocystis*** AARAEGRRTVPQIFVQDQGIGGCDQLYGLDSRQGLDPLLATPPNPA  
 Grx1 *Anabaena* PCC 7120 AERANGRRTPVQIFIQNQHIGGCDLYELDTKGQLDPLLVPQA---  
 Grx1 *A. Variabilis* ATCC 29413 AERANGRRTPVQIFIQNQHIGGCDLYELDTKGQLDPLLVPQA---  
 Grx1 *C. watsonii* WH 8501 AQRSSGKRSPVQIFVQNQHIGGCDLYSLDGGQNQLDPLLIMDNG--  
 Grx1 *T. erythraeum* IMS 10166 SERANRSRTVPQIFIQNQHIGGCDLYALDNKGQLEPLLIEVLDPD-  
 Grx1 *N. punctiforme* PCC 73102 AERANGRRTPVQIFIQNQHIGGCDLYQLDTQSLDPLLAQAIAI--

**Grx2**

**Grx2 *Synechocystis*** MAVSAKIEIYTWSTCPFCMRALALLKRKGVEFQEYCIDGDNEAREMAARANG  
 Grx2 *Anabaena* PCC 7120 MA--ATVEIYTWRTCPFCIRAKNLLNNKGVEFVEYSIDGDEEARDKMAQRANG  
 Grx2 *A. variabilis* ATCC 29413 MA--ATVEIYTWRTCPFCIRAKNLLNNKGVEFVEYSIDGDEEARDKMAQRANG  
 Grx2 *C. watsonii* WH 8501 MA--ANVEIYTWSTCPFCIRAKALLDKKGVNYTEYCIDGDEAREIMAERANG  
 Grx2 *T. erythraeum* IMS 101 MS--VNIIEIYTWSSCPFCISAKALLDKKQVNYQEYPIDGDDIEREKMACRANG  
 Grx2 *N. punctiforme* PCC 73102 MA--AKVEIYTWRTCPFCIRAKSLLKNKGVEFIEYSIDGDEAARNKMAQRANG  
 Grx *Synechococcus* sp. WH 8102 MA--KV--EIYTWRTCPFCVRAKGLLDRKGVSYTEHAVDGEPRDAMAARGDG  
 Grx *G. violaceus* PCC 7421 MN--PKVEIYTWQFQFPCIRAKALLKQKSVAFSEYAIIDGDEAARSAMAEARADG  
 Grx *T. elongatus* BP-1 MA--KV--EIYTWSRCPFCIRAKQLLTQKGVKFTYVIDGDEVARDAMAKRAHG  
 Grx *S. elongatus* PCC 6301--- MV--ANVEIYTWSAFCFVRAKALLTRKGVAFQEYVIDGDEAARAVMAQRANG  
 Grx *Prochlorococcus* MIT 9313 MA--KV--EIYTWQSCPFCLRAKALLDRKGVSYQEHAIDGDQAARAVMASRAGG  
 Grx *Prochlorococcus* CCMP 1986 MS--KV--EIYTWRFQFPCIRAKSLLKKNITFTEHKIDGDDNARELMMERANG  
 Grx *Prochlorococcus* CCMP 1375 MA--KV--EIYTWQYCFPCIRAKALLDLKKIDYDEYPIDGNQAEKMSIRAKG

**Grx2 *Synechocystis*** KRSLPQIFIDDDHIGGCDLIYALDGAGKLDPLLS----  
 Grx2 *Anabaena* PCC 7120 RRSLPQIFINDRHVGGCDIHALERQGLDELASSTSL  
 Grx2 *A. variabilis* ATCC 29413 RRSLPQIFINDRHVGGCDIHALERQGLDELLA  
 Grx2 *C. watsonii* WH 8501 KRSLPQIFINDGHVGGCNELYDTELAGELDSLEQSVAS  
 Grx2 *T. erythraeum* IMS 101 RNSLPQIFIDEEHIGGCDLYGLEAQGKLDRLKK----  
 Grx2 *N. punctiforme* PCC 73102 RRSLPQIFINDHIGGCDIHALDSQGRLDLTSV---  
 Grx *Synechococcus* sp. WH 8102 RRSVPQIFIDDRHIGGCDLHALERSGELDPLINA----  
 Grx *G. violaceus* PCC 7421 RRSVPQIFIDGKHIGGCDLYALDRSGQLDPLLVAS  
 Grx *T. elongatus* BP-1 RRSLPQIFIDNEHIGGCDLYALEAQGKLDALLQGVA--  
 Grx *S. elongatus* PCC 6301--- RRSVPQIFIDDDHIGGCDLHALDRQGLDPLLGLSA--  
 Grx *Prochlorococcus* MIT 9313 KNTLPQIFIDDLISIGGCDELHLEGAQKLDGLLQGV--  
 Grx *Prochlorococcus* CCMP 1986 KRTVPQIFIDDKSIGGCDELYLEKEDKLDLLN-----  
 Grx *Prochlorococcus* CCMP 1375 KTTVPQIFINNQSVMGCDLYALEESNQLDNLINQNK--

**Figure 31 : Alignement des séquences de Grx1 et de Grx2 avec leurs orthologues chez les cyanobactéries.** Alignements réalisés à l'aide du logiciel CLUSTALW. En rouge sont présentés les acides aminés invariants, en bleu les acides aminés très conservés, les cystéines sont représentées en vert.

**Grx1 et Grx2, sont des glutarédoxines à dithiol.** D'après CYANOBASE, *Synechocystis* possède 2 gènes qui codent pour des glutarédoxines à dithiol, caractérisées par la présence d'un site actif disulfure (CXXC) : *slr1562* et *ssr2061*. Ces gènes n'ayant jamais été étudiés (d'après revue [1]), nous les avons arbitrairement nommés *grx1* (*slr1562*) et *grx2* (*ssr2061*). Grx1 et Grx2 ont une très forte homologie de séquence (85% d'identité). Grx1 possède toutefois une extension N-terminale de 16 acides aminés, par rapport à Grx2. La fonction de cette extension est inconnue chez les glutarédoxines étudiées chez d'autres organismes. Ces deux glutarédoxines sont particulièrement conservées au sein des dix cyanobactéries dont le génome a été séquencé (Figure 31).

Grx2 possède des horthologues chez toutes ces cyanobactéries analysées, Grx1 n'est présente que chez certaines d'entre elles.

Les domaines fonctionnels (site actif CXXC et site de fixation du glutathion GGCD) sont très conservés chez les orthologues respectifs de Grx1 et Grx2 ; le site actif est de type CPFC. Toutefois, les horthologues de Grx1 ont pour la majorité un site actif de type CPYC ; seule Grx1 de *C. watsonii* possède aussi un site actif de type CPFC.

La présence d'une phénylalanine (F) au sein de leur site actif est une spécificité des cyanobactéries. Les orthologues de Grx1 et de Grx2 chez les autres organismes modèles la substitue par une tyrosine (Y) (Figure 32).

Grx1 <i>Synechocystis</i>	MANLFNWLPLLSGRQADGIKAKVEIYTWQ <b>TC</b> <b>PF</b> CIRAK---- <b>LLL</b> WWKGV <b>KF</b> IEYKIDG--DDQA
Grx2 <i>Synechocystis</i>	-----MAVSAKIEIYTWS <b>TC</b> <b>PF</b> CMRAL---- <b>ALL</b> KRKGV <b>EF</b> QEYCIDG--DNEA
GrxC <i>E. coli</i>	-----ANVEIYTKET <b>CP</b> YCHRAK---- <b>ALL</b> SSKGV <b>SF</b> QELPIDG--NAAK
Grx1 <i>S. cerevisiae</i>	-----VSQETIKHVKDLIAENEIVFASKTY <b>CP</b> Y <b>CHA</b> ALNTLFEK <b>LK</b> VPRSKVLVLQNDMKEGAD
At5g40370 <i>A. thaliana</i>	-----MAMQKAKEIVNSESVVFSKTY <b>CP</b> Y <b>CVR</b> VK---- <b>ELL</b> QQL <b>GAK</b> FKAVEL <b>DT</b> ESDGSQ
Grx1 <i>H. sapiens</i>	-----AQEFV <b>NC</b> KIQPGKVVFVFIK <b>PT</b> CPY <b>CRR</b> AQEILSQ <b>LP</b> IKQ <b>GL</b> LEFVDITATNHTNEI
Grx1 <i>Synechocystis</i>	<b>RQ</b> AMAA <b>RAEGR</b> TV <b>PQ</b> IFVNDQG- <b>IGG</b> <b>CD</b> QLYGLDS <b>RG</b> Q <b>LD</b> <b>P</b> LLATPPNPA-----
Grx2 <i>Synechocystis</i>	<b>RE</b> AMAA <b>RANGK</b> RS <b>L</b> PQ <b>IF</b> IDDQ <b>H</b> - <b>IGG</b> <b>CD</b> DIYALDGAG <b>KLD</b> <b>P</b> LLHS-----
GrxC <i>E. coli</i>	REEMIKRS-G <b>RT</b> TV <b>PQ</b> IFIDAQ <b>H</b> - <b>IGG</b> <b>CD</b> LYALDARG <b>G</b> LD <b>P</b> LLK-----
Grx1 <i>S. cerevisiae</i>	<b>I</b> QAALYEING <b>Q</b> RT <b>V</b> PN <b>I</b> YING <b>KH</b> - <b>IGG</b> <b>N</b> DDLQELRET <b>G</b> E <b>LE</b> EL <b>L</b> EPILAN-----
At5g40370 <i>A. thaliana</i>	<b>I</b> QSGLA <b>EW</b> T <b>G</b> Q <b>R</b> TV <b>P</b> NV <b>I</b> FG <b>NH</b> - <b>IGG</b> <b>C</b> DATSN <b>L</b> HKD <b>G</b> K <b>L</b> V <b>P</b> LLTEAGAIAGKTATTSA
Grx1 <i>H. sapiens</i>	- <b>Q</b> DYLQQL <b>T</b> G <b>A</b> RT <b>V</b> PT <b>R</b> VFIGKD <b>C</b> <b>IGG</b> <b>C</b> SD <b>L</b> V <b>S</b> LQ <b>Q</b> S <b>G</b> EL <b>L</b> TR <b>L</b> KQIGALQ-----

**Figure 32 : Alignement des séquences de Grx1 et de Grx2 de *Synechocystis* avec leurs orthologues chez *E. coli*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana* et *H. sapiens*.** Alignements réalisés à l'aide du logiciel de comparaison de séquences CLUSTALW. En rouge sont présentés les acides aminés invariants, en bleu les acides aminés très conservés, les cystéines sont représentées en vert.

Le site de fixation du glutathion (GG(C/N)(D/S)) contient en général une cystéine lui conférant la propriété de former un pont disulfure avec une molécule de GSH. Ce site est également très conservé. La cystéine présente dans ce site est capable de former un pont disulfure intermoléculaire avec le glutathion. Cependant, l'absence de la cystéine dans le site de fixation du glutathion de Grx1 et Grx2 de *S. cerevisiae* est à noter. Cela pose la question de sa fonction glutarédoxine, de cette protéine définie comme sa propriété d'être réduite par le glutathion. Il a toutefois été montré que cette glutarédoxine était fonctionnelle, bien que le mécanisme de sa réduction n'ait pas été mis en évidence [250].

**Grx3 *Synechocystis*** -----MNPETKARIDQLVTANKVMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGIP  
 ZP\_00107743 *N. punctiforme* PCC 73102 -----MTPELKEKIDNLLQQNKILVFMKGNKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 Alr0799 *Anabaena* PCC 7120 -----MTQETSEKINNLTQNKIMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 YP32\_21110 *A. variabilis* ATCC 29413 -----MTQETSEKISNLITQNKIMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 YCF64 *T. elongatus* BP-1 MQFCNWSTQEEKRTMTPELHAKIDNLVKSNIIVFMKGSKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 YP\_171115 *S. elongatus* PCC 6301 -----MTPELQERLTSIINGDKIVVFMKGNKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 AAD19873 *Synechococcus* sp. PCC7942 -----MTPELQERLTSIINGDKIVVFMKGNKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 ZP\_00518290 *C. watsonii* WH 8501 -----MTPELKDRIIDQLVNNKILVFMKGAKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 CAE21270 *Prochlorococcus* MIT 9313 -----MDPTTKTRIEALIQSSPIMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 NP\_875477 *Prochlorococcus* CCMP 1375 -----MNLETRARIEDLINSHSIMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 CAE07421 *Synechococcus* sp. WH 8102 -----MDDSTRSRIEALISSSTIFVFMKGSKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 ZP\_00674291 *T. erythraeum* IMS 101 -----MTLTPELKAKIIDDLVTKNIMVFMKGNKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 YP\_291833 *P. marinus* str. NATL2A -----MDSNTRSKIESLINSKPIVFMKGNKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP  
 NP\_893228 *Prochlorococcus* CCMP 1986 -----MENPTKNKIQNLDLNPVMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGVP

**Grx3 *Synechocystis*** FET--LLADAEIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDIMIELYQNGEL--QEMLEVALAS  
 ZP\_00107743 *N. punctiforme* PCC 73102 FETVDVLSDEIRQGIKEYSNWPTIPQVYINGEFVGGSDILIELYQKQEL--QKVEVALAS  
 Alr0799 *Anabaena* PCC 7120 FETINVLEDQEIRQGIKEYSNWPTIPQVYINGEFVGGSDILIELYQKQEL--QKVEVALAS  
 YP32\_21110 *A. variabilis* ATCC 29413 FETINVLEDQEIRQGIKEYSNWPTIPQVYINGEFVGGSDILIELYQKQEL--QKVEVALAS  
 YCF64 *T. elongatus* BP-1 YETVDVLEDFEIRQGIKEYSNWPTIPQVYINGEFVGGSDILIELYQKQEL--QKVEVALAS  
 YP\_171115 *S. elongatus* PCC 6301 FETVDVLSADYDIREIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS  
 AAD19873 *Synechococcus* sp. PCC7942 FETVDVLSADYDIREIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS  
 ZP\_00518290 *C. watsonii* WH 8501 YETVDVLSADEEIRQGIKEYSNWPTIPQVYINGEFVGGSDILIELYQKQEL--QKVEVALAS  
 CAE21270 *Prochlorococcus* MIT 9313 FETFDVLSDEIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS  
 NP\_875477 *Prochlorococcus* CCMP 1375 FETFDVLSDEIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS  
 CAE07421 *Synechococcus* sp. WH 8102 FETFDVLSDEIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS  
 ZP\_00674291 *T. erythraeum* IMS 101 YETCDVLENDQIRTGIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS  
 YP\_291833 *P. marinus* str. NATL2A FETFDVLSDEIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS  
 NP\_893228 *Prochlorococcus* CCMP 1986 FNTFDVLSDFEIRQGIKEYSEWPTIPQVYVNGEFVGGSDILIELYQNGEL--QKVEVALAS

**Figure 33 : Alignement de la séquence de Grx3 de *Synechocystis* avec ses orthologues chez les cyanobactéries.** Alignements réalisés à l'aide du logiciel CLUSTALW. En rouge sont présentés les acides aminés invariants, en bleu les acides aminés très conservés, les cystéines sont représentées en vert.

**Grx3 *Synechocystis*** -----MNPETKARIDQLVTANKVMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGIP---FETL--  
 NP\_416171 *E. coli* -----MSTTIEK-IQRQIAENPILLYMKGSPKLPSCGFSQAQVQALAACGER---FAYVDI  
 Grx5 *S. cerevisiae* -----MFLPKFNPIRSFSPILRAKTLLR  
 At3g54900 *A. thaliana* MALRSVKTPTLITSVAVVSSVTNKPHSIRFSLKPTSALVHNNHLSFYGSNLKLPKTKF  
 Grx5 *H. sapiens* -----MSGSLGRAAAALLRWGRGAGGGGLWGPVGR

**Grx3 *Synechocystis*** -----MNPETKARIDQLVTANKVMVFMKGTKLMPQCGFSNNVVQILNMLGIP---FETL--  
 NP\_416171 *E. coli* -----MSTTIEK-IQRQIAENPILLYMKGSPKLPSCGFSQAQVQALAACGER---FAYVDI  
 Grx5 *S. cerevisiae* YQNRMYLSTEIRKAIEDAIESAPVVLFMKGTPEFPKCGFSRATIGLGNQGVDPKFAAYNV  
 At3g54900 *A. thaliana* RCSASALTPLQKDTLEKLVNSEKVVLFMKGTRDFPMCGFSNTVVQILKLNLPV---FEDVNI  
 Grx5 *H. sapiens* AAGSGAGGGGSAEQDLALVKKDKVVFLLKGTPEQPQCGFSNAVVQILRLHGVDRDYAAYNV---

**Grx3 *Synechocystis*** LADAEIRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGSDIMIELYQNGELQEMLEVALAS-----  
 NP\_416171 *E. coli* LQNPDIRAELPKYANWPTFPQLWVDGELVGGCDIVIEMYQRGELQQLIKETAAYKSE-----  
 Grx5 *S. cerevisiae* LEDPELREGIKFSEWPTIPQLYVNKEFIGGCDVITSMARSSELADLLEEAQALVPEE-----  
 At3g54900 *A. thaliana* LENEMLRQGLKEYSNWPTFPQLYIGGEFFGGCDITLEAFKTEGELQEEVEKAMCS-----  
 Grx5 *H. sapiens* LDDPELRQGIKEYSNWPTIPQVYVNGEFVGGCDILLQMHQNGDLVEELKKLGIHSAALLDEKKDQDSK

**Figure 34 : Alignement de la séquence de Grx3 de *Synechocystis* avec ses orthologues chez *E. coli*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana* et *H. sapiens*.** Alignements réalisés à l'aide du logiciel de comparaison de séquences CLUSTALW. En rouge sont présentés les acides aminés invariants, en bleu les acides aminés très conservés, les cystéines sont représentées en vert.

**Grx3 est une glutarédoxine à monothiol.** Le génome de *Synechocystis* possède deux glutarédoxines à dithiol (Grx1 et Grx2). Nous avons par ailleurs repéré par homologie de séquences une troisième glutarédoxine putative. Celle-ci, codée par slr1846, serait à monothiol (site actif CXXS). Elle est identifiée comme Protéine hypothétique YCF64 dans CYANOBASE. Je l'ai arbitrairement appelée Grx3. Les alignements de séquences prédisent que cette protéine appartient à une sous-famille des glutarédoxines, nouvellement décrite, appelée PICOT pour Protein kinase C-Interacting-cousin-of-thioredoxin. Cette appellation est liée à la propriété de la première glutarédoxine PICOT analysée, d'interagir avec la protéine kinase C-jun [112]. Comme le montrent la Figure 33 et la Figure 34, les glutarédoxines PICOT sont très conservées entre elles. Cependant, leur séquence primaire est très différente de celle des glutarédoxines à dithiol « classiques » précédemment décrites. Chez *Synechocystis*, Grx3 possède une très faible homologie avec Grx1 et Grx2 (respectivement 5 et 6% d'identité).

Toutes les cyanobactéries possédant des orthologues de Grx1 et Grx2 en possède aussi un de Grx3. Celui de *G. violaceus* possède une séquence primaire peu conservée (Glr3340) (non figuré). Le site actif de type CGFS est strictement identique chez Grx3 et ses orthologues (Figure 33, Figure 34). Toutes ces glutarédoxines ont un site de fixation du glutathion dont la cystéine active est remplacée par une sérine (GGSD). Cette substitution peut remettre en cause la fonction de ce site. Une telle substitution a déjà été observée dans la Grx1 et la Grx2 de *S. cerevisiae* dont l'activité glutarédoxine ont pourtant été mises en évidence [250] (voir plus haut). Elle est aussi absente de deux protéines d'*A. thaliana* (At4g04950 et At3g15660) très homologues à Grx3 de *Synechocystis* (non figuré). *A contrario*, cette cystéine est présente chez les orthologues de Grx3 chez les organismes modèles *E. coli*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana* et *H. sapiens* (Figure 34). Ces glutarédoxines ont un site actif identique à celui de Grx3 et peuvent aussi avoir des cystéines supplémentaires dans leur séquence (Grx5 *S. cerevisiae* et At3g54900 d'*A. thaliana*) pouvant être à l'origine de propriétés oxydoréductrices nouvelles.

Enfin, une séquence très homologue à la Grx2 d'*E. coli* (GST-like) [116] précédemment décrite (voir Introduction) a été identifiée chez *Synechocystis*. Il s'agit de la séquence *sll1902*, définie comme une protéine ayant une fonction inconnue dans CYANOBASE. Bien que *Synechocystis* possède quatre glutathione S-transferases putatives (Sll0067, Sll1147, Sll1545 et Slr0236), il est intéressant de noter que Sll1902 est le seul homologue de Grx2 d'*E. coli*.

Pour analyser le rôle des glutarédoxines de *Synechocystis* dans la réponse cellulaire aux stress oxydants, j'ai construit les mutants (simples et multiples) des différentes glutarédoxines

de *Synechocystis* afin de tester leur rôle dans la réponse cellulaire et notamment dans la tolérance aux stress.

## II. Les glutarédoxines sont impliquées dans la réponse cellulaire au stress oxydant

### A. Construction des mutants dépourvus de glutarédoxines

Les constructions des mutants d'inactivation ont été réalisées en substituant indépendamment (simples mutants) ou successivement (mutants multiples) la phase codante des gènes codant pour les glutarédoxines par un gène marqueur codant pour la résistance à un antibiotique ( $km^r$ ,  $sm^r$ ,  $cm^r$ ) (voir Matériel et Méthodes). Les cassettes de résistance sont dépourvues de terminateurs de transcription, ce qui permet de ne pas affecter l'expression des gènes situés en aval des gènes inactivés.

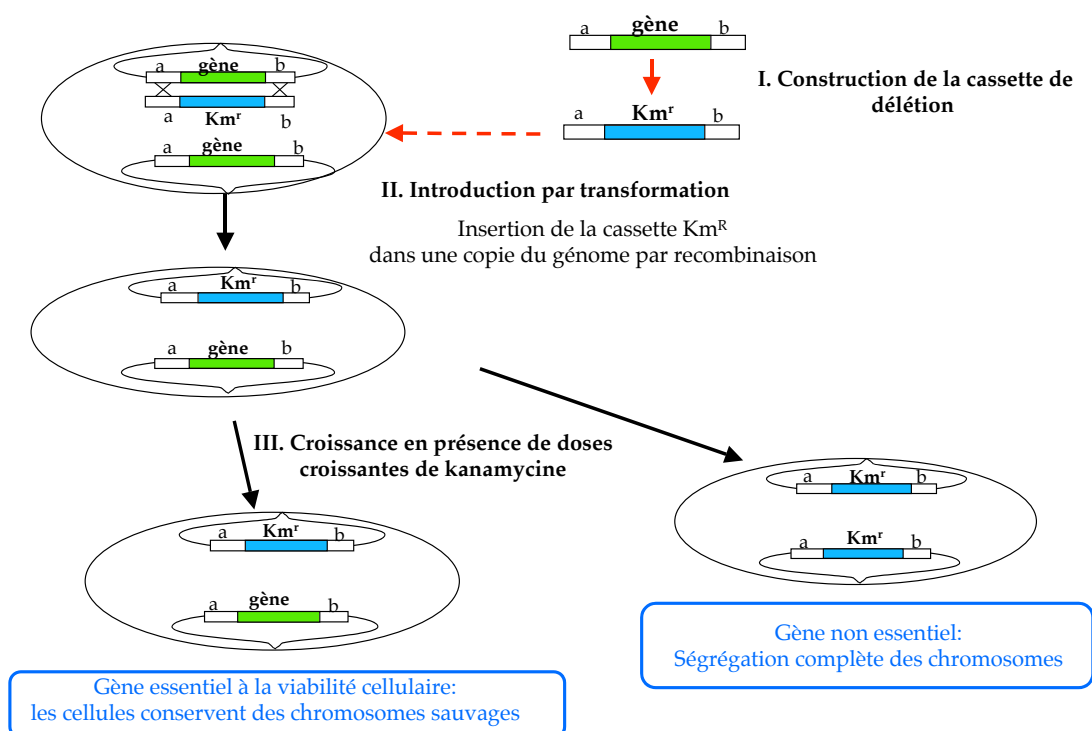


Les cassettes de délétion construites, soit les constructions *grx1::Km*, *grx2::Sm*, *grx3::Cm* ont été introduites indépendamment dans *Synechocystis* par transformation (voir Matériel et Méthodes et Figure 35) pour obtenir chacun des simples mutants (Tableau 7).

Plasmide	Description
<b>Plasmides utilisés</b>	
pGEMt	Vecteur de clonage AT Amp <sup>R</sup> (Promega)
pUC4K	Source du marqueur Km <sup>R</sup> (Pharmacia)
pFC1	Source des marqueurs Sm <sup>R</sup> (Prentki P, 1991) et Cm <sup>R</sup> (Mermet-Bouvier, 1994)
<b>Plasmides hébergeant les gènes codant pour les glutarédoxines <i>Synechocystis</i></b>	
pGrx1	pGEMt avec le gène <i>grx1</i> flanqué par 300 pb en amont du codon « start » et 300 pb en aval du codon stop
pGrx2	pGEMt avec le gène <i>grx2</i> flanqué par 267 pb en amont du codon « start » et 307 pb en aval du codon stop (construit par F. Domain)
pGrx3	pGEMt avec le gène <i>grx3</i> flanqué par 300 pb en amont du codon « start » et 300 pb en aval du codon stop
<b>Construction des cassettes d'inactivation</b>	
p□Grx1	pGrx1 avec le marqueur Km <sup>R</sup> inséré entre les nucléotides 5 et 104 de <i>grx1</i>
p□Grx2	pGrx2 avec le marqueur Sm <sup>R</sup> inséré en sens inverse à la place de <i>grx2</i>
p□Grx3	pGrx3 avec le marqueur Cm <sup>R</sup> inséré entre les nucléotides 2 et 99 de <i>grx3</i>

**Tableau 7 : Constructions des cassettes d'inactivation des glutarédoxines de *Synechocystis*. D'après les références [251], [25]**

J'ai ensuite construit les doubles mutants □*grx1*□*grx2* et □*grx1*□*grx3* en introduisant respectivement les constructions *grx2::Sm* et *grx3::Cm* dans le mutant □*grx1*. Le mutant □*grx2*□*grx3* a été obtenu en introduisant la construction *grx3::Cm* dans le mutant □*grx2*. Enfin, le triple mutant □*grx1*□*grx2*□*grx3* a été obtenu en introduisant la construction *grx3::Cm* dans le mutant □*grx1*□*grx2*.



**Figure 35 : Principe de l'inactivation d'un gène par transformation chez *Synechocystis*.** Après transformation, les différentes copies sauvages sont ségréguées en exerçant une pression de sélection. *Synechocystis* possède 10 copies de chromosome, seules deux d'entre elles sont représentées dans ce schéma.

La transformation ne permet la substitution que d'une copie sauvage du gène ciblé. Les autres copies sauvages sont ségréguées en exerçant une pression de sélection avec l'antibiotique correspondant. Toutes les constructions ont été vérifiées par PCR et séquençage. Les PCR permettent de vérifier que les cassettes sont intégrées correctement dans le génome ainsi que la présence de copie de chromosome sauvage. Aucune copie sauvage ne doit réapparaître lorsque la pression de sélection est relâchée. La ségrégation est totale si le gène n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire dans les conditions physiologiques testées (voir Figure 35).

Tous ces mutants (simples et multiples) sont viables en conditions standard de croissance. Toutes les copies de chromosomes sauvages ont été totalement ségréguées (vérification par PCR, voir Matériel et Méthodes). Ces gènes ne sont donc pas essentiels à la viabilité cellulaire. Cependant, l'inactivation du gène *grx3* entraîne une augmentation du temps de génération de la souche mutante correspondante ( $\Delta grx3$ ) et également de celles des souches  $\Delta grx1\Delta grx3$ ,  $\Delta grx2\Delta grx3$  et  $\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$  (Tableau 9).

Souches	Temps de génération (h) (conditions standards de croissance)
Souche sauvage (WT)	10 $\pm$ 1
$\Delta grx1$	10 $\pm$ 1
$\Delta grx2$	10 $\pm$ 1
$\Delta grx3$	20 $\pm$ 1
$\Delta grx1\Delta grx3$	20 $\pm$ 1
$\Delta grx2\Delta grx3$	20 $\pm$ 1
$\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$	20 $\pm$ 1

**Tableau 9 : L'inactivation de *grx3* entraîne une augmentation du temps de génération.** Temps de génération des différentes souches mutantes et sauvage dans des conditions standard de croissance.

Le mutant  $\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$  est viable. Ceci met en évidence que le système glutarédoxine n'est pas indispensable à la viabilité cellulaire dans des conditions standard de croissance. Ce résultat est à mettre en parallèle avec l'existence d'un autre système de contrôle de l'homéostasie des thiols cellulaires, les thiorédoxines (Trxs). En effet, dans des conditions standard de croissance, il a été démontré, chez *S. cerevisiae*, que la seule présence de l'un ou de l'autre de ces systèmes est suffisante à la croissance cellulaire [68]. Nous pouvons donc supposer que chez *Synechocystis* les thiorédoxines possèdent des fonctions redondantes avec les glutarédoxines. L'inverse ne semble pas être vrai car il a été montré qu'au moins trois des cinq thiorédoxines de *Synechocystis* sont indispensables à la viabilité cellulaire (TrxM2 (Slr1057), TrxA2 (Slr1139), TrxA3 (Slr1980)) [252]. Il est même possible que TrxA1 (Slr0623) soit également essentielle à la viabilité cellulaire [253], ce résultat n'a pas été confirmé par [252]).

## B. Contenu pigmentaire des mutants dépourvus des glutarédoxines

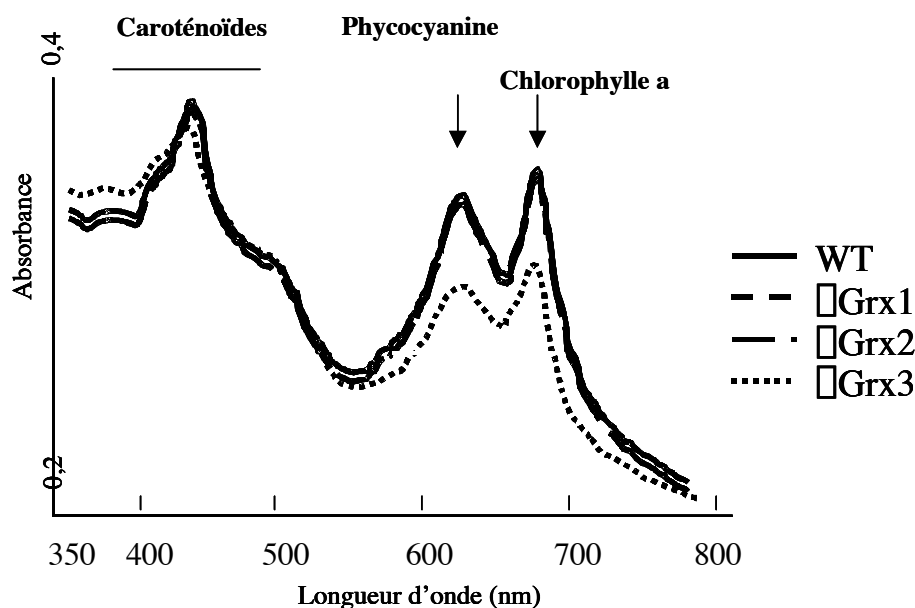
L'un des premiers phénotypes visibles d'un mutant de *Synechocystis* est sa couleur. Cette couleur est la résultante de la présence de pigments photosynthétiques dans les thylakoïdes (caroténoïdes (jaune-orange), phycobiliprotéines (bleu), chlorophylle (vert)). La couleur de la souche sauvage est bleu-verte.

Chez *Synechocystis*, le contenu pigmentaire est modifié dans des conditions de stress oxydant. Certaines inactivations de gènes importants (tels que certains codant pour des ferrédoxines) provoquent les mêmes effets (résultats du laboratoire, non publiés).

J'ai analysé le phénotype des simples mutants dépourvus de glutarédoxines ( $\Delta grx1$ ,  $\Delta grx2$  et  $\Delta grx3$ ) par spectrophotométrie (voir Matériel et Méthodes) et j'ai comparé ces spectres à celui de la souche sauvage (WT) (Figure 37).

Dans des conditions standard, les souches  $\Delta grx1$  et  $\Delta grx2$  ont une couleur et un contenu de pigments semblable à celui de la souche sauvage. Par contre, le mutant  $\Delta grx3$  présente une couleur jaune-verte et un contenu pigmentaire différent. Le « premier pic », correspondant aux caroténoïdes semble légèrement augmenté, ce qui est observé dans ces situations de stress. D'autre part, on observe une chute drastique de la phycocyanine et de la chlorophylle a, ce qui correspond à une diminution de l'activité photosynthétique et peut être corrélé au ralentissement de la croissance observé (deux fois plus faible, 20 h) par rapport à la souche sauvage (WT) (9-10h) dans des conditions standard de croissance (Tableau 9).

Les résultats concernant le mutant  $\Delta grx3$  ont aussi été obtenus par les études similaires (spectre d'absorption et vitesse de croissance) réalisées sur les mutants multiples  $\Delta grx1\Delta grx3$ ,  $\Delta grx2\Delta grx3$  et  $\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$ .



**Figure 37 : L'absence de Grx3, mais pas de Grx1 ni Grx2, modifie le contenu pigmentaire de *Synechocystis*.** Spectre d'absorption de la souche et des mutants dans les conditions standard de culture (en phase exponentielle de croissance,  $DO_{580}=0,4$ , voir Matériel et Méthodes)

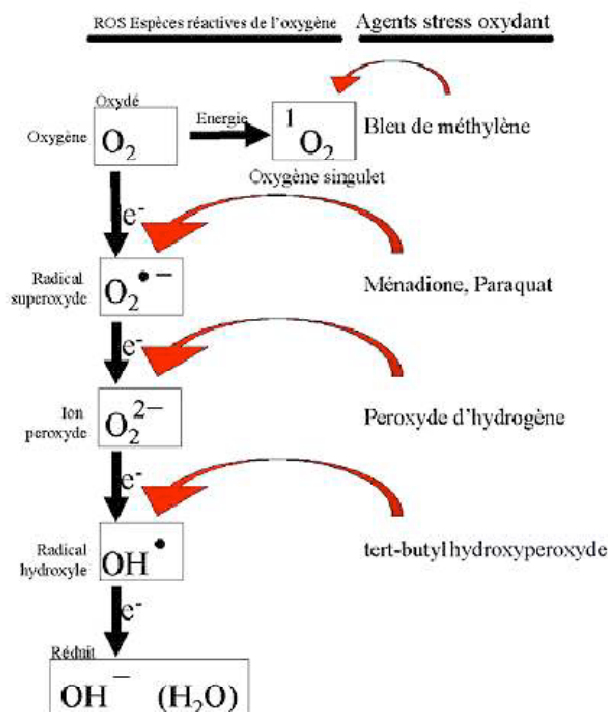
Certains pigments ont des propriétés antioxydantes (caroténoïdes, phycobiliprotéines) [254] [255]. Leur dégradation peut être interprétée comme la conséquence d'une élévation de la concentration des ERO cytoplasmiques. La chute sélective de la phycocyanine et de la chlorophylle a est une caractéristique du mutant  $\Delta grx3$ . Elle semblerait montrer que Grx3 serait impliquée dans des voies métaboliques rédox spécifiques, nous pouvons émettre l'hypothèse de la photosensibilité du mutant  $\Delta grx3$ . Celle-ci pourrait être testée en comparant les vitesses de croissance de ce mutant à différentes intensités lumineuses.

AGENTS OXYDANTS	Concentration finale sur boîte
Peroxyde d'hydrogène	32 $\mu$ M, 34 $\mu$ M, 36 $\mu$ M
Bleu de méthylène	600 nM, 700nM, 800 nM
ter-butylperoxyde	50 nM, 70 nM, 700 nM
Paraquat	30 $\mu$ M, 50 $\mu$ M
Ménadione	100 nM, 1 $\mu$ M
Diamide	10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M

METAUX	Concentration finale sur boîte
Sulfate de cadmium (CdSO <sub>4</sub> )	3 $\mu$ M, 3,5 $\mu$ M, 4.5 $\mu$ M
Sélénate de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> )	10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M
Sélénite de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	300 $\mu$ M, 400 $\mu$ M, 500 $\mu$ M
Acétate d'uranyle ((CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> UO <sub>2</sub> )	700 $\mu$ M, 800 $\mu$ M
Chlorure de mercure (HgCl <sub>2</sub> )	2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M
Arsenite (Na <sub>2</sub> AsO <sub>3</sub> )	200 $\mu$ M, 400 $\mu$ M
Chlorure de zinc (ZnCl <sub>2</sub> )	19 $\mu$ M, 25 $\mu$ M

**Tableau 10 : Conditions de culture et concentration des agents toxiques utilisés.**  
Concentration des agents toxiques utilisés.



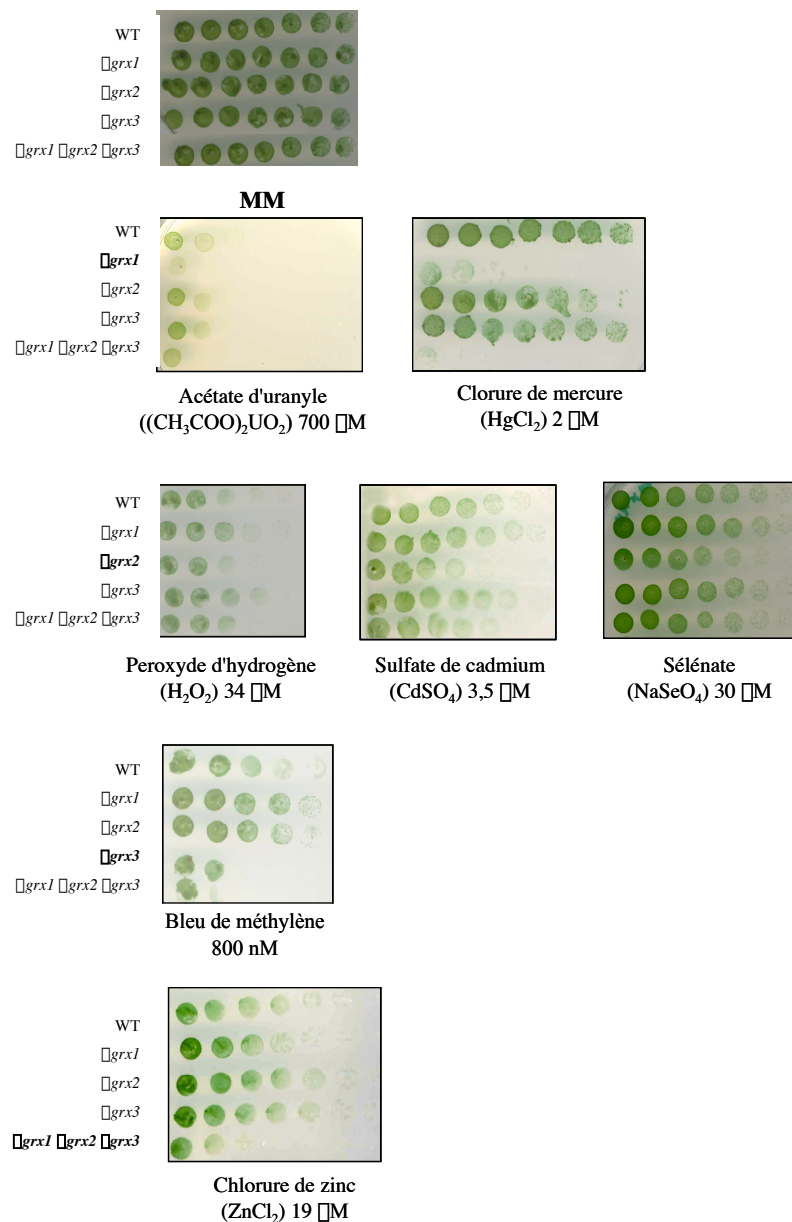
**Figure 38 : Différentes formes d'ERO générées par les agents oxydants**

### C. Rôle des glutarédoxines dans la tolérance aux stress

Afin d'analyser le rôle des glutarédoxines en réponse aux stress oxydants et métalliques, j'ai analysé les 7 mutants (simples et multiples) dépourvus des 3 glutarédoxines (*grx1*, *grx2* et *grx3*) en présence d'agents oxydants et de métaux (Tableau 10). Nous avons testé l'influence de ces toxiques sur la croissance et la viabilité des 7 mutants de glutarédoxines. Les différents agents oxydants génèrent des formes variées d'ERO comme le montre la Figure 38. Les métaux génèrent aussi des ERO et possèdent une toxicité propre (voir Introduction). Nous avons sélectionné des métaux toxiques trouvés fréquemment dans l'environnement.

Pour réaliser ces tests, les souches mutants et la souche sauvage ont été cultivées en milieu liquide BG11 jusqu'à une  $DO_{580}$  d'environ 0,5 (milieu de la phase exponentielle de croissance). Des dilutions successives de ces cultures (x4) ont été déposées en série de 6 gouttes de 10  $\mu$ l sur des boîtes de milieu BG11 + agar contenant ou non des concentrations variées d'un composé toxique (voir Matériel et Méthodes). Ceci permet de comparer finement les sensibilités des différentes souches. Les boîtes sont incubées dans des conditions standard (température : 30°C, intensité lumineuse : 2500 lux). Tous les tests présentés ont été réalisés en duplicat et reproduits à partir de trois cultures différentes de chaque souche.

Les doses de toxicité des différents agents ont été déterminées au préalable sur une souche sauvage de *Synechocystis* (Tableau 10).



**Figure 39 : Tolérance des souches sauvage et mutantes  $\Delta grx1$ ,  $\Delta grx2$ ,  $\Delta grx3$  et  $\Delta grx1 \Delta grx2 \Delta grx3$  à divers agents oxydants et aux métaux.** Des dilutions (x4) des différentes souches sont déposées (10  $\mu$ L) sur des milieux solides contenant ou non des agents toxiques. Les cultures sont incubées pendant 4-5 jours à 30°C à une intensité lumineuse de 2500 lux.



Parmi l'ensemble des tests réalisés, seuls ceux sur lesquels une sensibilité des mutants dépourvus de glutarédoxines a été observée sont présentés Figure 39 et résumés dans le Tableau 11. En conditions standard, les mutants ont une croissance semblable à celle de la souche sauvage. Le retard de croissance du mutant  $\Delta grx3$  n'est pas visualisable sur ce type de test. Les résultats montrent que les glutarédoxines interviennent dans la tolérance à divers stress oxydants et métalliques (Figure 39).

Le mutant  $\Delta grx1$  est peu sensible à l'acétate d'uranyle ( $(CH_3COO)_2UO_2$ ) (l'acétate est parfaitement toléré par *Synechocystis*) et très sensible à une faible dose de chlorure de mercure ( $HgCl_2$ ).  $\Delta grx1$  n'est pas sensible au chlorure de zinc ( $ZnCl_2$ ), ce mutant n'est donc pas sensible aux ions chlorure et nous pouvons conclure à la sensibilité de ce mutant au mercure. Ce résultat nous a incité à tester le rôle de Grx1 dans la régulation de l'activité de la réductase du mercure (MerA). Nous avons effectivement montré, *in vitro*, que Grx1 intervient dans le contrôle de l'état redox du site actif de cet enzyme (voir Chapitre II). D'autre part  $\Delta grx1$  est résistant au bleu de méthylène (Figure 39).

L'inactivation de *grx2* confère une sensibilité au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), au sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ), au sélénate ( $Na_2SO_4$ ) ainsi qu'au chlorure de mercure. Nous observons, d'autre part, une résistance de ce mutant au bleu de méthylène ainsi qu'au chlorure de zinc.

Enfin, l'inactivation de *grx3* confère une sensibilité au bleu de méthylène et une résistance au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et au chlorure de zinc ( $ZnCl_2$ ) (Figure 39).

Parfois, la sensibilité au stress des mutants multiples est plus sévère que celle du plus sensible des simples mutants correspondants. Ainsi le triple mutant possède une sensibilité spécifique au chlorure de zinc. Cette sensibilité n'est observée chez aucun simple et double mutant. Ceci est vrai à l'exception de la moindre sensibilité du triple mutant par rapport au mutant  $\Delta grx2$  en réponse au peroxyde d'hydrogène. Cela peut être expliqué par l'augmentation de résistance à ce toxique due à l'absence de Grx3 dans ce mutant (Figure 39).

Le Tableau 11 résume l'ensemble de ces résultats.

Souches	Acétate d'uranyle (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> UO <sub>2</sub> 700 $\mu$ M	Chlorure de mercure HgCl <sub>2</sub> 2 $\mu$ M	Peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 34 $\mu$ M	Sulfate de cadmium CdSO <sub>4</sub> 3,5 $\mu$ M	Sélénate de sodium Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30 $\mu$ M	Bleu de méthylène 800 nM	Chlorure de zinc ZnCl <sub>2</sub> 19 $\mu$ M
$\Delta grx1$	S	SS	R	-	-	R	-
$\Delta grx2$	-	S	S	S	S	RR	R
$\Delta grx3$	-	-	R	-	-	S	R
$\Delta grx1\Delta grx2$	S	SS	S	S	S	RR	S
$\Delta grx1\Delta grx3$	S	SS	R	-	-	S	S
$\Delta grx2\Delta grx3$	-	S	S	S	S	S	R
$\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$	S	SS	S	-	-	SS	SS

**Tableau 11 : Sensibilité et résistance des mutants dépourvus de glutarédoxines en réponse aux stress oxydant et métallique, en comparaison avec la souche sauvage.** - : sensibilité identique à celle de la souche sauvage (WT), S : sensible, SS : très sensible, R : résistant, RR : très résistant.

Cette analyse des différents mutants des glutarédoxines de *Synechocystis* nous a montré que ces protéines interviennent dans la réponse au stress oxydant et que chacune d'entre elles est vraisemblablement impliquée dans des voies de détoxification différentes. Pour mieux comprendre le rôle des glutarédoxines et leur sélectivité, j'ai recherché leurs partenaires grâce à un crible double hybride.

### III. Identification de nouveaux partenaires des glutarédoxines

#### A. Description du système de test double hybride bactérien

Nous avons utilisé le système bactérien fourni par Hybrigenics® [256] plutôt que le système double hybride de levure car certains gènes d'intérêt du laboratoire comme ceux codant pour les ferrédoxines donnaient un résultat positif lors des contrôles préliminaires (apparition de faux positifs lors du test de ces séquences contre un plasmide vide). D'autre

part, le système double hybride levure ne permettait pas de tester des interactions avec des protéines membranaires. Enfin, ce système bactérien a déjà permis la validation d'interactions au laboratoire [26].

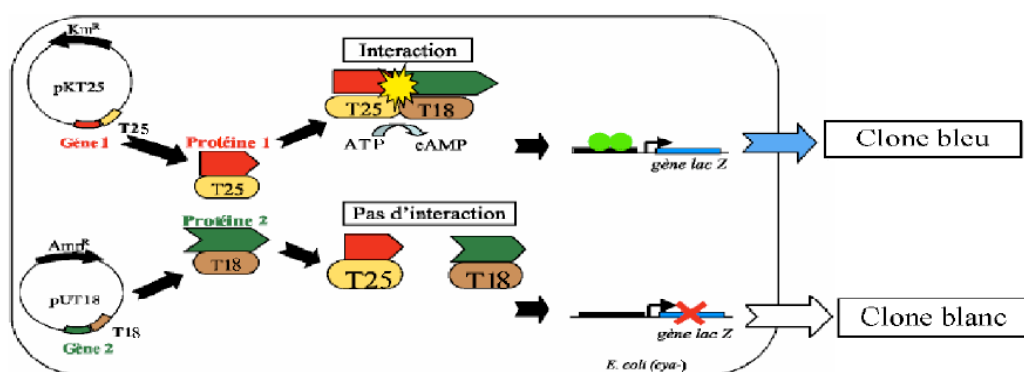
Le principe du système double hybride bactérien utilisé est résumé dans la Figure 40 (pour plus de détails voir le chapitre Matériel et Méthodes).

La participation de trois personnes de l'équipe a permis la réalisation d'une banque de 60 gènes clonés dans les deux plasmides du système double-hybride. J'ai réalisé la moitié des constructions.

J'ai cloné les 3 gènes *grx1*, *grx2* et *grx3* dans chacun des vecteurs (pUT18 et pKT25). J'ai également cloné les gènes codant pour les protéines impliquées dans les systèmes de contrôle du métabolisme rédox, puis des protéines possédant des motifs structuraux putatifs susceptibles de leur conférer une fonction oxydoréductrice (motifs disulfides CX<sub>n</sub>C, centre Fe/S, site de liaison à un co-facteur). Réaliser un crible double hybride ciblé sur les protéines du métabolisme rédox limite le caractère aléatoire des interactions recherchées. Toutefois, l'intérêt de ce type de crible repose sur le fait que les gènes sont clonés en séquence entière, permettant le repliement correct des protéines, d'où une très grande fiabilité des résultats obtenus.

Avant de tester une nouvelle protéine, il est nécessaire de réaliser un test préliminaire afin de s'affranchir des faux positifs. Pour cela, nous testons toutes les séquences contre un plasmide vide. Moins de 5% des séquences testées sont concernées.

La première confirmation d'un résultat positif trouvé dans un sens d'interaction (par exemple entre deux partenaires A et B, pUT18::A – pKT25 ::B) est de l'obtenir dans l'autre sens de test possible (ici pUT18::B – pKT25 ::A).



	Couleur Clone	pKT25	pUT18	Activité spéc. b-gal
Témoin +	Bleu	Zip	Zip	4 213 ± 215
Témoin -	Blanc	Vide	Vide	75 ± 4

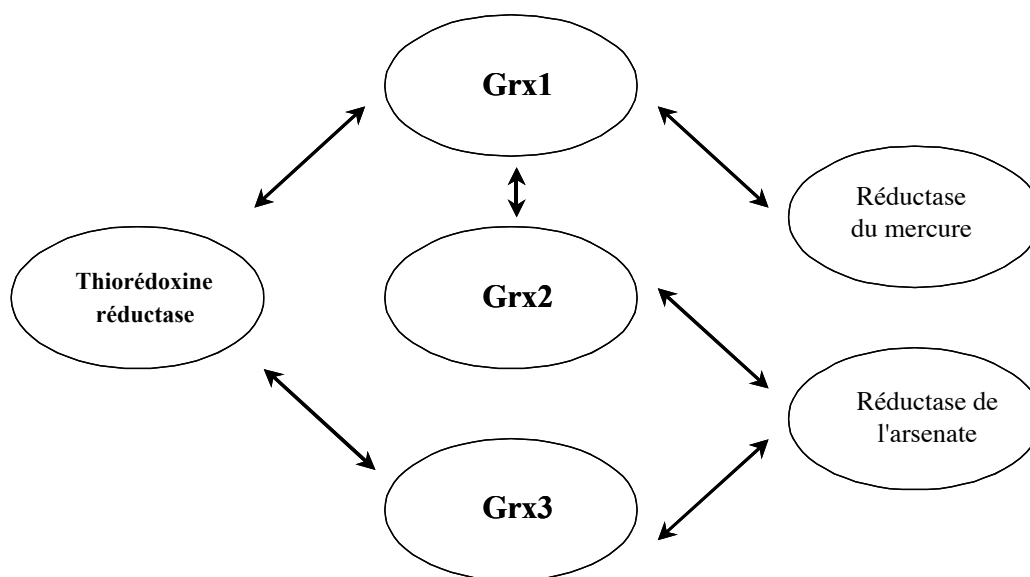
**Figure 40: Principe du système double hybride bactérien Hybrigenics® [256].** T25 et T18 sont deux domaines de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*. Protéines 1 et 2 : deux protéines cibles testées pour leur possible interaction (voir Matériel et Méthodes). Les valeurs des dosages  $\beta$ -gal des témoins positif ( $>4000$ ) et négatif ( $<100$ ) sont très discriminantes.

## B. Interactions identifiées

Potentiellement, ce système permet le test de 3000 interactions. Sur l'ensemble des tests réalisés (environ 1000), nous avons mis en évidence 23 interactions originales, confirmées au moins 3 fois.

Parmi les interactions identifiées, nous avons analysé celles impliquant 1) des glutarédoxines et des ferrédoxines, 2) des réductases de métaux et des glutarédoxines et 3) la thiorédoxine réductase (TR) et des glutarédoxines. Toutes les interactions que nous avons analysées au laboratoire, ayant été mises en évidence à l'aide de cet outil, ont été confirmées par d'autres approches *in vitro* comme *in vivo* (mutagenèse, analyses biochimiques, études physiologiques). Aucun faux positif n'a donc été sélectionné par notre stratégie.

Je me suis particulièrement intéressé à trois types d'interactions impliquant des glutarédoxines (voir Figure 41). J'ai tout d'abord analysé l'interaction observée entre Grx1 et la réductase du mercure (MerA). Celle-ci avait déjà été suggérée par la sensibilité du mutant  $\Delta grx1$  au chlorure de mercure (Chapitre II).



**Figure 41 : Interactions identifiées grâce à la technique du double hybride entre les glutarédoxines, la thiorédoxine réductase, la réductase du mercure et la réductase de l'arsenate.** Ces interactions ont été confirmées au moins quatre fois en test double hybride.

## Chapitre II □ Caractérisation de nouvelles voies rédox de régulation de l'activité des réductases métaux

Nous avons vu précédemment (Chapitre I partie III.B) que les glutarédoxines Grx1 et Grx2 interagissaient avec respectivement la réductase du mercure (MerA, Slr1849) et la réductase de l'arsenate (ArsC, Slr0946). ArsC codée par le chromosome de *Synechocystis* est homologue à la réductase de l'arsenate de *S. aureus*, qui est réduite par les thiorédoxines [232] (voir Introduction, Chapitre V partie III.B.1). Nos résultats montrent qu'en réalité elle pourrait fonctionner avec le système glutarédoxine.

### I. ArsC de *Synechocystis* interagit avec Grx2 et Grx3

Par la technique du double hybride, j'ai montré qu'ArsC pouvait interagir avec Grx2 et Grx3 (Figure 42). Je n'ai pas testé l'interaction entre ArsC et les thiorédoxines car les tests préliminaires réalisés avec des membres de cette famille (TrxA1 et TrxM1) donnent des faux positifs contre le vecteur vide.

Gènes clonés dans le vecteur testeur pKT25	Gènes clonés dans le vecteur testeur pUT18			
	vide	<i>grx1</i> <i>slr1562</i>	<i>grx2</i> <i>ssr2061</i>	<i>grx3</i> <i>slr1846</i>
vide	105 ± 21	67 ± 8	72 ± 11	93 ± 10
<i>arsC</i> <i>slr0946</i>	89 ± 17	97 ± 14	<b>1684 ± 138</b>	<b>1384 ± 97</b>
<i>merA</i> <i>slr1849</i>	58 ± 5	<b>1836 ± 97</b>	65 ± 12	74 ± 13

**Figure 42 : ArsC interagit avec Grx2 et Grx3 tandis que MerA interagit avec Grx1.** Dosages  $\square$ -gal des tests d'interactions d'ArsC et MerA avec les glutarédoxines. (valeurs en nmol d'ONPG.min<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup>). Les interactions positives sont figurées en gras.

Une publication récente a mis en évidence, par test d'activité sur protéines purifiées, la réduction *in vitro* d'ArsC de *Synechocystis* en présence de glutathion et de la GrxC d'*E. coli* [236]. Ce résultat renforce la validité de l'interaction que nous avons mise en évidence entre ArsC et Grx2. J'ai mis ici en évidence une spécificité de fonction de Grx2. D'après l'étude de

Shi *et col.*, l'interaction entre des glutarédoxines et ArsC est directement liée à la réduction du site actif d'ArsC par celui des glutarédoxines.

Ce résultat nous permet d'émettre l'hypothèse d'une nouvelle voie de réduction d'ArsC codée par le chromosome de *Synechocystis*, celle-ci pouvant être redondante avec la voie des thiorédoxines. Une analyse *in vitro* de l'activité de cette enzyme en présence de thiorédoxines ou de glutarédoxines purifiées pourra être réalisée. Le même test pourra être réalisé avec les deux autres réductases de l'arsenate codées par les plasmides prédites (sur la base d'homologie de séquences, voir Introduction, Chapitre V partie III.B.1) comme étant des partenaires des glutarédoxines.

## II. Mise en évidence et analyse de l'interaction Grx1-MerA

Pour confirmer et analyser l'interaction entre Grx1 et MerA, 1) j'ai réalisé la mutagenèse des deux protéines partenaires puis, 2) j'ai confirmé leur interaction en utilisant une technique biochimique (ici le GST Pulldown) et 3) des tests d'activité *in vitro* sur les protéines purifiées. Enfin, j'ai réalisé des tests de complémentation *in vivo* des mutants correspondants en réponse à des stress métalliques avec des protéines sauvages et des protéines mutées.

### A. Analyse de l'interaction Grx1-MerA par mutagenèse dirigée

Pour confirmer et analyser l'interaction entre Grx1 et MerA, j'ai tout d'abord mutagénéisé les cystéines de Grx1.

D'autre part, je me suis basé sur le fait que MerA interagisse avec Grx1, et pas avec Grx2 (Figure 44) pour repérer les acides aminés impliqués dans cette interaction. J'ai recherché ceux qui étaient invariants dans la séquence des orthologues de Grx1 chez deux cyanobactéries (*Anabaena sp. PCC 7120* et *Trichodesmium erythraeum IMS10*) et absents de Grx2 (Figure 42). Comme Grx1 et Grx2 ont une forte homologie (85% d'identité), les acides aminés repérés par cette stratégie sont peu nombreux.

```

Grx1 Synechocystis  MANLFWLPLLSGRQADGIKAKVEIYTWTCPPCIRAKLLLVWKGVKFIEYKIDGDDOARQAMAAAEGRRTVPQIFVNDGIGGCCDLYGLDSRGQLDPLLATPPNPA-
Grx1 Anabeneae       MSNLFNQLFGRSPAKIKANVEIYTWTCPPCIRAKLLLVWKGVPFTEYKIDGDEAARANMAERANGRRTPQIFINNQHIGGCCDLYELDTKGQLDPLLVQPA----
Grx1 Trichodesm     MLDFLNPILGRHPRMKAKVEIYTWTCPPCIRAKLLLVWKGVNYTEYKIDGNESARNSMSERANRSRTVPQIFINNQHIGGCCDIYALDNKGQLEPLLEVLDPD--

Grx2 Synechocystis  MAVSAKIEIYTWSTCPPCMRALALLKRKGVEFQFQYCYIDGNEAREMAARANGKRSRSLPQIFIDDOHIGGCCDIYALDAGKLDPLLS-----
Grx2 Anabeneae       MAATVEIYTWRTCPFCIRAKNLLNKGVEFVEYSIDGDEEARDKMAQRANGRRSLPQIFINDRHVGGCDDIHALERQGLDELLASSTSL--
Grx2 Trichodesm     MSVNIIEIYTWSSCPFCISAKALLDKQVNYQFPIIDGDDIEREKMACRANGRRSLPQIFIDEEHIGGCCDIYGLEAQKLDRLKK-----

```

**Figure 42 : Alignement des séquences de Grx1 et Grx2 de *Synechocystis* avec leurs orthologues chez *Anabaena sp. PCC 7120* (*Anabaena*) et *Trichodesmium erythraeum IMS10* (*Trichodesm*). Les acides aminés conservés dans la séquence des Grx1 et absents des séquences des Grx2 sont figurés en bleu. Les cystéines du site actif CXXC et la cystéine du site de fixation du glutathion (GGCD) sont figurées en rouge.**

Les acides aminés conservés dans la séquence de Grx1 et absents de celle de Grx2 sont les résidus Q29, K52 et T72, V73, et Q96. Je les ai remplacés indépendamment dans la séquence de Grx1 par les acides aminés correspondants dans la séquence de Grx2 (mutations Q29L, TV72SL et Q96L). Je n'ai pas appliqué cette stratégie pour mutagéniser la lysine 52 de Grx1. En effet, l'acide aminé de Grx2 correspondant à ce résidu est une cystéine (résidu ayant des propriétés rédox). J'ai donc réalisé la mutation K52A (dont la chaîne latérale  $-CH_3$  n'est pas réactive).

La stratégie de mutagenèse de MerA est plus complexe. Hormis la description du fonctionnement de la réduction du mercure par MerA [238], peu de connaissances sont disponibles sur le rôle des différents acides aminés de MerA. J'ai donc choisi de mutagéniser les cystéines (du site actif C78-C83), ainsi que les autres cystéines (C205, C219 et C345) chez les homologues de MerA d'autres organismes (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). D'autre part, j'ai mutagénisé deux acides aminés chargés (E70, D246) situés dans l'environnement du site actif et conservés chez des homologues de MerA (Homme et *B. subtilis*) (la localisation est basée sur l'homologie de MerA de la dihydrolipoamide deshydrogenase, qui a été cristallisée par K.R.Rajashankar (chez *Mycobacterium tuberculosis*)).



Chacune des cystéines analysées a été substituée par une sérine, les autres acides aminés ont été changés en alanine.

Les valeurs des dosages de l'activité  $\beta$ -gal correspondantes sont présentées en Figure 44.

	<i>grx1</i> <i>slr1562</i>	<i>grx2</i> <i>ssr2061</i>	<i>grx3</i> <i>slr1846</i>
<i>merA</i> <i>slr1849</i>	1836 ± 97	65 ± 12	74 ± 13

pUT18	pKT25	Dosages $\beta$ -galactosidase (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
<b>zip</b>	<b>zip</b>	<b>4236 ± 113</b>
vide	vide	89 ± 8

<b>merA</b>	<b>grx1</b>	<b>1836 ± 97</b>
-------------	-------------	------------------

<b>merA</b>	<b>grx1Q29L</b>	<b>1071 ± 47</b>
<b>merA</b>	<b>grx1C31S *</b>	<b>2161 ± 25</b>
<b>merA</b>	<b>grx1C34S *</b>	<b>1221 ± 54</b>
merA	grx1 K52A	39 ± 5
<b>merA</b>	<b>grx1TV72SL</b>	<b>1838 ± 87</b>
merA	grx1C86S ■	292 ± 14
merA	grx1Q96L	308 ± 13

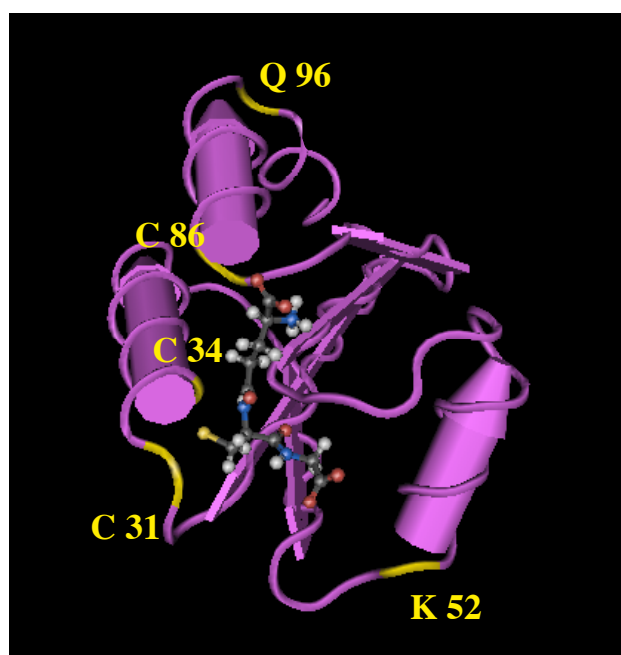
merA E70A	grx1	64 ± 12
merAC78S *	grx1	93 ± 16
<b>merAC83S *</b>	<b>grx1</b>	<b>2096 ± 182</b>
<b>merAC205S</b>	<b>grx1</b>	<b>1974 ± 179</b>
<b>merAC219S</b>	<b>grx1</b>	<b>1845 ± 118</b>
<b>merAD246A</b>	<b>grx1</b>	<b>1411 ± 62</b>
<b>merAC345S</b>	<b>grx1</b>	<b>1689 ± 134</b>

**Figure 44 : Analyse de l'interaction Grx1-MerA par mutagenèse dirigée.** Les cystéines impliquées dans les sites actifs de Grx1 et de MerA sont suivies du sigle (\*). La cystéine de Grx1 impliquée dans le site de fixation du glutathion est suivie du sigle (■). Les interactions positives sont figurées en gras.

J'ai identifié trois acides aminés de Grx1 (lysine 52, cystéine 86 et glutamine 96) nécessaires à l'interaction avec MerA (les valeurs des dosages de l'activité dosages  $\beta$ -gal correspondants sont inférieures à 300). La cystéine 86, localisée dans le site de fixation du glutathion, est également impliquée dans les interactions entre Grx1 et Grx2 ainsi qu'avec TR (voir Chapitre II de la partie Résultats). La glutamine 29 de Grx1 semble impliquée mais dans

une moindre mesure (diminution de la valeur du dosage de l'activité  $\beta$ -gal d'un facteur 2).

Afin de localiser ces résidus dans l'espace, j'ai utilisé la structure de GrxC d'*E.coli* [93] fortement homologue à Grx1 (voir Chapitre I). Les acides aminés de Grx1 (lysine 52 et cystéine 86) impliqués dans l'interaction avec MerA sont co-localisés dans l'espace situés autour du site actif CXXC (voir la structure tridimensionnelle (Figure 44)). En revanche, la glutamine 96 se trouve à l'extrémité C-terminale de la protéine. La cystéine 86, localisée dans le site de fixation du glutathion (GGCD), se trouve à proximité du site actif.



**Figure 44 : Localisation tridimensionnelle des acides aminés de Grx1 impliqués dans l'interaction avec MerA (lysine 52, cystéine 86 et glutamine 96). D'après la structure de GrxC d'*E.coli* [93]).**

Par mutagenèse de MerA, j'ai montré que l'acide glutamique 70 et la cystéine 78 appartenant au site actif C78-C83 de cette protéine sont impliqués dans l'interaction avec Grx1 (valeurs des dosages de l'activité  $\beta$ -gal inférieures à 100).

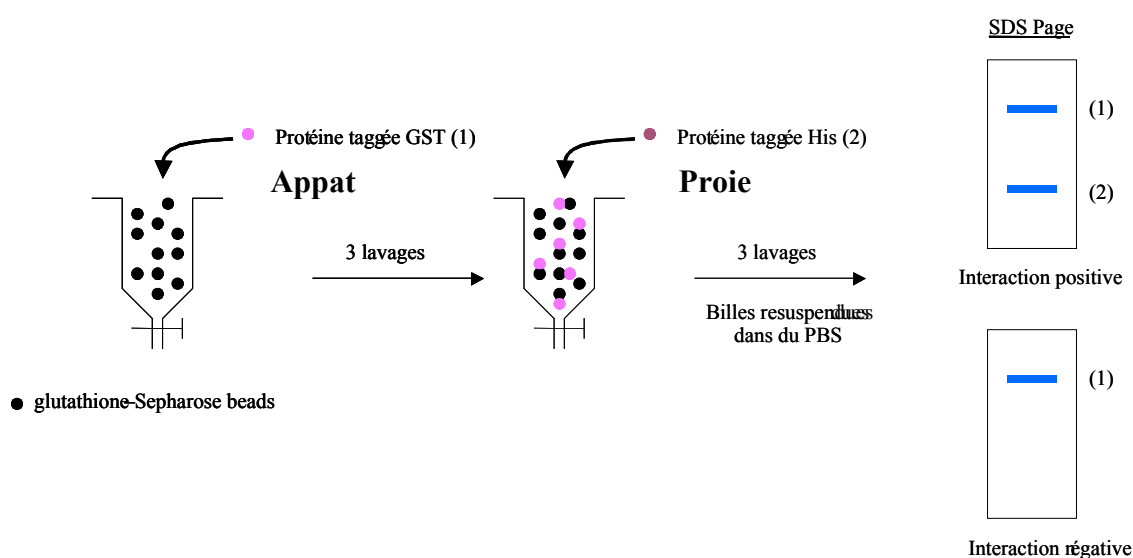
Le site actif de MerA (cystéine 78) et son environnement électronique (acide glutamique 70) sont donc directement impliqués dans l'interaction avec Grx1.

J'ai émis l'hypothèse d'une interaction entre la cystéine 86 de Grx1, fixant le glutathion, et la cystéine 78 de MerA, situé dans le site actif. J'ai confirmé cette interaction en utilisant une technique biochimique (le GST Pulldown).

## B. Validation de l'interaction Grx1-MerA par GST Pulldown

Le GST Pulldown est un test biochimique d'« interaction » réalisé avec des extraits bruts contenant des protéines analysées, fusionnées à des étiquettes (Tags) distinctes : 6 Histidines (His) ou la glutathion-S-transferase (GST). La GST est une enzyme de 14 kDa ayant la propriété de se lier au glutathion réduit (GSH).

La protéine appât fusionnée à la GST, présente dans le premier extrait brut, peut se fixer sur des billes glutathionylées (la GST se lie aux résidus de glutathion). Les protéines n'ayant pas d'affinité pour le GSH sont éluées par des lavages successifs. L'extrait contenant la deuxième protéine fusionnée au Tag histidine (proie) est incubée avec le mélange précédent. Si les deux protéines interagissent, alors la seconde protéine sera retenue par la première préalablement fixée sur les billes. Dans le cas contraire, elle sera éluée lors des différents lavages (voir Matériel et Méthodes). Le témoin de ce test consiste à vérifier que la protéine proie fusionnée au Tag histidine ne se fixe pas à la GST (seule), fixée sur les billes. Un schéma du principe du GST Pulldown est présenté en Figure 45.

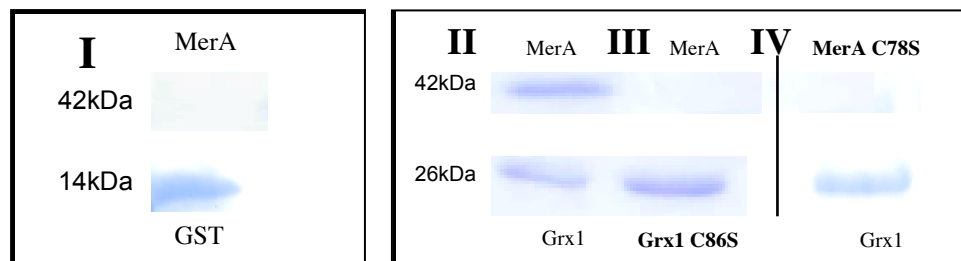


**Figure 45 : Principe du GST Pulldown.** La protéine taggée GST (1) est l'appât. La protéine taggée His (2) est la proie.

Afin de réaliser ce test, j'ai surproduit les protéines de fusion GST-Grx1 (protéine appât) et MerA-His (correspondants à la protéine de fusion MerA-6His, protéine proie) (voir Matériel et Méthodes pour les constructions). J'ai également surproduit les versions mutées MerAC78S-His et GST-Grx1C86S (cystéines critiques à l'interaction de ces deux protéines).

Les tests ont été effectués directement sur les extraits cellulaires bruts (voir Matériel et Méthodes).

Le résultat de ce test est présenté en Figure 46.



**Figure 46 : Confirmation biochimique de l'interaction entre Grx1 et MerA (Technique du GST Pull-down).** Les protéines ont été séparées sur un gel SDS Page en conditions réductrices puis colorées au bleu de Comassie. Les tailles des protéines fusionnées MerA-His et GST-Grx1 sont respectivement de 42 kDa et 26 kDa. (I) Témoin de non-fixation de MerA-His à la GST. (II) Mise en évidence de l'interaction entre MerA-His et GST-Grx1. La cystéine 86 de Grx1 (III) et la cystéine 78 de MerA (IV) sont critiques pour l'interaction entre ces deux protéines.

J'ai tout d'abord réalisé l'expérience témoin qui consiste à vérifier que MerA-His ne peut pas se fixer à la GST libre. Pour cela, j'ai incubé un extrait brut contenant la GST libre surproduite, fixée au préalable sur les billes glutathionylées. Après lavage, j'ai incubé l'extrait brut contenant la protéine de fusion MerA-His. Celle-ci n'est pas retenue après lavage sur les billes. MerA n'interagit donc pas avec la GST (Figure 46, piste I).

J'ai ensuite réalisé la même expérience en utilisant la protéine de fusion GST-Grx1 comme appât. Après élution finale, j'ai alors visualisé les bandes correspondant aux protéines de fusion GST-Grx1 et MerA-His sur une même piste d'électrophorèse. Cela signifie que MerA-His peut être retenue par des billes glutathionylées liées à la fusion GST-Grx1 (Figure 46, piste II). Cette bande correspond bien à MerA-His car sa position correspond à la taille de la protéine de fusion (42 kDa) (vérifiée lors de purification de la protéine de fusion MerA-His, voir Matériel et Méthodes). Elle est d'autant plus distinguishable que son intensité est bien supérieure à celle de toutes les autres protéines de l'extrait (conditions d'induction de la production en présence d'IPTG, résultat non montré).

En revanche, lorsque le test est réalisé avec la protéine mutante GST-Grx1C86S, MerA-His n'est pas retenue après élution (Figure 46, piste III). De même, la fusion MerAC78S-His n'est pas retenue par la fusion initialement utilisée GST-Grx1 (Figure 46, piste IV). J'ai par ailleurs confirmé l'importance des résidus cystéine 86 de Grx1 et cystéine 78 de MerA dans cette interaction.

L'hypothèse d'une réaction d'oxydoréduction « classique » faisant intervenir le site actif (C<sub>31</sub>XXC<sub>34</sub>) de Grx1 a été écartée puisque le site actif de Grx1 n'est pas directement impliqué dans cette interaction (Figure 44).

Certaines enzymes comme la PAPS réductase peuvent réagir avec le glutathion, qui se fixe au niveau des cystéines de son site actif CXXC. Cette réaction, dite de glutathionylation, l'inactive. La PAPS réductase glutathionylée est alors capable de réagir avec une glutarédoxine, qui catalyse la réaction inverse, dite de déglutathionylation, la rendant à nouveau active [33] (voir Introduction). Cette réaction implique le site actif de la glutarédoxine.

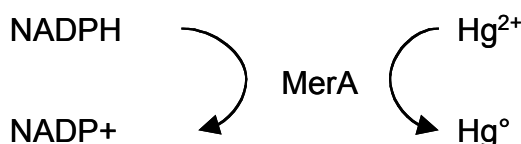
J'ai donc émis l'hypothèse que MerA pouvait être glutathionylée sur la cystéine 78 de son site actif, ce qui inactiverait son activité enzymatique. La réaction de déglutathionylation serait catalysée par Grx1 ; via sa cystéine 86, située dans le site de fixation du glutathion, et pourrait alors lever cette inhibition.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai mesuré l'activité *in vitro* de ces deux enzymes avant et après mutagenèse des divers cystéines.

### C. Régulation de l'activité de MerA par glutathionylation/déglutathionylation

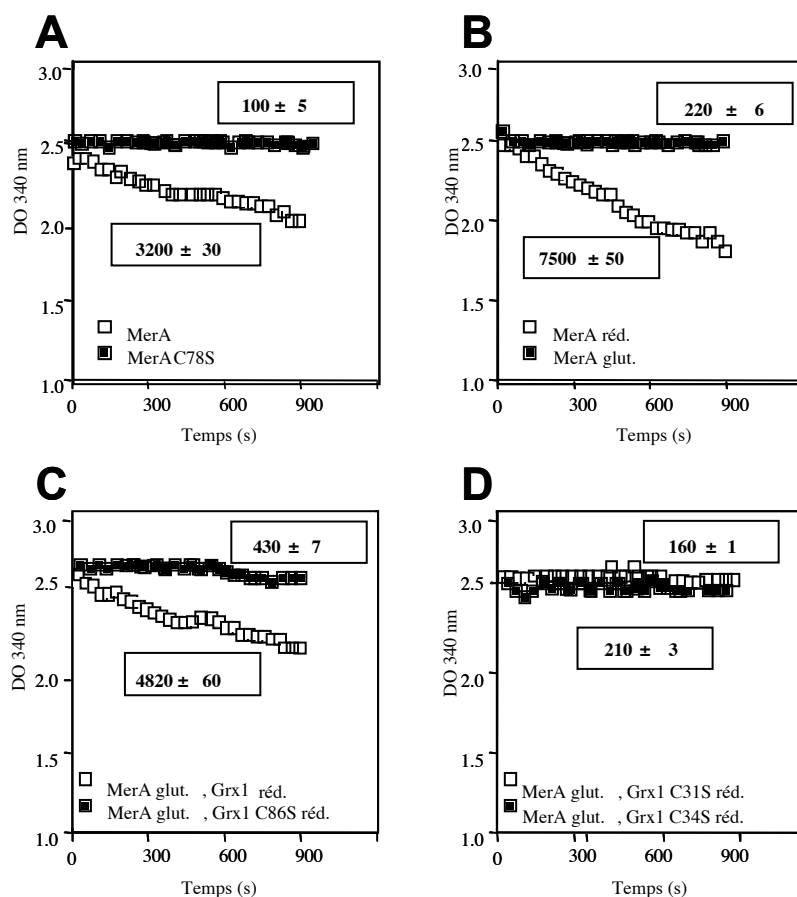
Pour réaliser ce test, j'ai utilisé les protéines fusionnées au Tag histidine (MerA-His et His-Grx1, précédemment décrites) et j'ai construit les formes mutantes correspondantes (MerAC78S-His, His-Grx1C31S, His-Grx1C34S et His-Grx1C86S). La purification de ces protéines sur colonne de Nickel a été réalisée selon un protocole classique (voir Matériel et Méthodes).

Le test d'activité est basé sur la propriété de MerA d'utiliser directement le pouvoir réducteur du NADPH (via son co-facteur FAD) pour réduire l'ion Hg<sup>2+</sup> en Hg élémentaire (Hg<sup>0</sup>) (voir Figure 47) (d'après [238]).



**Figure 47 : MerA réduit le Hg<sup>2+</sup> en Hg<sup>0</sup> en utilisant directement le pouvoir réducteur du NADPH. D'après [238].**

Les tests ont été réalisés en duplicat sur deux échantillons de chaque protéine purifiée. Les résultats sont présentés dans la Figure 48.



Activité spécifique (en nmol de NADPH.Min<sup>-1</sup>. mg de protéines<sup>-1</sup>)

**Figure 48 : Mise en évidence *in vitro* de la glutathionylation de MerA par Grx1.** MerA : Réductase du mercure, Grx1 : glutarédoxine 1, forme réduite : réd., forme glutathionylée : glut. Les concentrations de réactifs utilisés sont les suivantes : 0,2 mM NADPH ; 100  $\mu$ M de HgCl<sub>2</sub> ; 0,5  $\mu$ M de MerA, 0,5  $\mu$ M des différentes formes de Grx1. Les valeurs indiquées dans les encadrés correspondent aux activités spécifiques de MerA, mesurées en nmol<sup>-1</sup> de NADPH.min<sup>-1</sup>.mg protéine<sup>-1</sup>.

J'ai tout d'abord vérifié que la protéine de fusion MerA-His était fonctionnelle (Figure 48, A). J'ai ensuite confirmé que la cystéine 78 de cette protéine était impliquée dans le site actif C<sub>78</sub>X<sub>4</sub>C<sub>83</sub>. Sa mutagenèse (C78S) abolit l'activité de MerA-His (pas de consommation du NADPH) (Figure 48, A).

J'ai ensuite glutathionylé *in vitro* la protéine de fusion MerA-His. Cette réaction a été réalisée en réduisant la protéine avec du DTT, puis en la faisant réagir avec du glutathion réduit (formation d'un pont disulfure mixte entre une cystéine réduite et une molécule de

glutathion), comme décrit dans [33], voir (Matériel et Méthodes). La forme réduite est fonctionnelle, son activité est même deux fois supérieure à celle de la protéine de fusion initiale, par contre la forme glutathionylée de MerA est inactive (Figure 48, B).

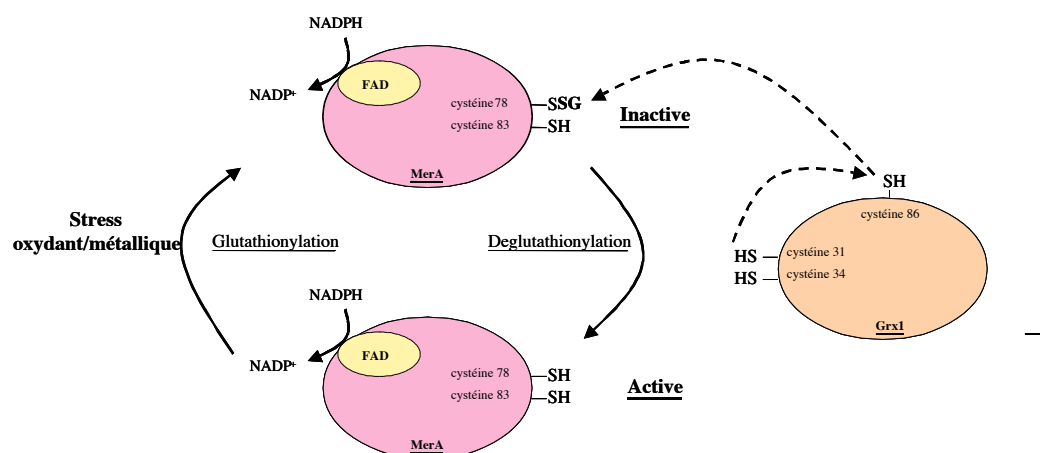
J'ai alors cherché les conditions de réactivation de cette enzyme (déglutathionylation) par Grx1 que j'ai utilisée sous sa forme réduite, comme décrit précédemment ([33], voir (Matériel et Méthodes)).

En présence de la forme réduite de Grx1, j'ai observé que la forme glutathionylée de MerA était fonctionnelle (Figure 48, C). L'activité de réduction du mercure mesurée peut uniquement être due à l'activité de MerA car Grx1 ne possède pas de co-facteur et est donc incapable d'utiliser le NADPH (témoin non figuré). Nous pouvons donc supposer que Grx1 est capable de réactiver MerA en la déglutathionylant. Cette réaction n'a pas été observée avec la version mutée de la protéine réduite Grx1C86S (Figure 48, C). De même, la mutation des cystéines du site actif de Grx1 (C31S et C34S) ne lui permet pas de restaurer l'activité de MerA glutathionylée (Figure 48, D). L'activité de déglutathionylation de Grx1 est donc dépendante de ses trois cystéines.

Nous pouvons donc supposer que Grx1 est capable de prendre en charge le glutathion fixé sur MerA via le résidu cystéine 86, dont l'état redox serait sous le contrôle du site actif C<sub>31</sub>XXC<sub>34</sub> et conditionnerait sa réactivité avec le glutathion.

Nous avons donc pu mettre en évidence l'interaction de Grx1 et MerA à l'aide du système double hybride. Celle-ci a été confirmée par mutagenèse dirigée. J'ai montré que la cystéine 86 (située dans le site de fixation du glutathion) et la cystéine 78 de MerA (située dans le site actif C78X4C83) sont nécessaires à cette interaction. Ce résultat a été confirmé sur des protéines purifiées (GST Pulldown). L'analyse de l'activité de Grx1 et de MerA a finalement permis de mettre en évidence que MerA est inactivée réversiblement par la réaction de glutathionylation et que Grx1 a la propriété de catalyser la réaction inverse de déglutathionylation. Si le site actif de Grx1 joue un rôle clé dans sa fonction de déglutathionylation, la cystéine qui réagit directement avec le glutathion fixé sur le site actif de MerA est la cystéine 86, directement impliquée dans cette interaction. Cette cystéine, localisée dans le site de fixation du glutathion, a bien la capacité de fixer cette molécule.

Un modèle fonctionnel de cette interaction est présenté ci après (Figure 49).



**Figure 49 : Modèle de la déglutathionylation de MerA catalysée par Grx1.** Les flèches en pointillé indiquent les transferts d'électrons



Plasmide	Description
<b>Plasmides utilisés</b>	
pGEMt	Vecteur de clonage AT AmpR (Promega)
pUC4K	Source du marqueur Km <sup>R</sup> (Pharmacia)
<b>Plasmides hébergeant les gènes codant pour les réductase à métaux, MerA et ArsC</b>	
pMerA	pGEMt avec la partie N-terminale du gène <i>merA</i> (1-357 pb) flanqué par 126 pb en amont du codon « start »
pArsC	pGEMt avec le gène <i>arsC</i> flanqué par 300 pb en amont du codon « start » et 300 pb en aval du codon stop
<b>Construction des cassettes d'inactivation</b>	
p□MerA	pMerA avec le marqueur Km <sup>R</sup> inséré au niveau du nucléotide 84 de <i>merA</i> (insertion d'un site SmaI)
p□ArsC	pArsC avec le marqueur Km <sup>R</sup> inséré entre les nucléotides 7 et 230 d' <i>arsC</i>

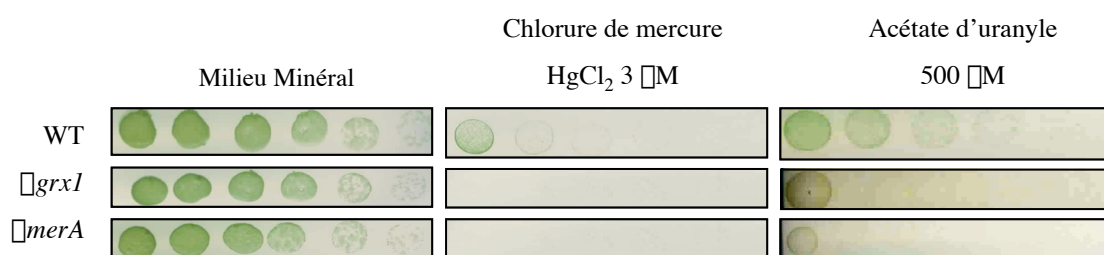
**Tableau 13 : Caractéristiques des cassettes d'inactivation des réductases à métaux ArsC et MerA.**

## D. Implication de Grx1 et MerA en réponse aux stress métalliques

### 1. Les mutants $\Delta grx1$ et $\Delta merA$ sont sensibles au mercure et à l'uranium

Le mutant  $\Delta grx1$  est sensible au mercure et à l'uranium, comme je l'ai montré précédemment (Figure 39). Un mutant dépourvu de la réductase du mercure ( $\Delta merA$ ) a été construit (Tableau 13). Ce gène n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire, toutes les copies sauvages ont été ségréguées en conditions standard de culture.

J'ai testé la sensibilité du mutant  $\Delta merA$  au chlorure de mercure et à l'acétate d'uranyle (voir Figure 50). La sensibilité du mutant  $\Delta merA$  au chlorure de mercure est une confirmation de sa propriété catalytique de réduction du mercure *in vivo*. En revanche sa sensibilité à l'uranium n'avait jamais été décrite. De façon générale, la toxicité chimique de l'uranium n'est pas très étudiée, les mécanismes cellulaires de résistance sont très peu connus [257], [258].



**Figure 50 : Mise en évidence de la sensibilité de  $\Delta grx1$  et  $\Delta merA$  au chlorure de mercure et à l'acétate d'uranyle.** MM : milieu minéral. Ces tests en goutte ont été réalisés à partir de culture en phase exponentielle de croissance (DO=0,5).

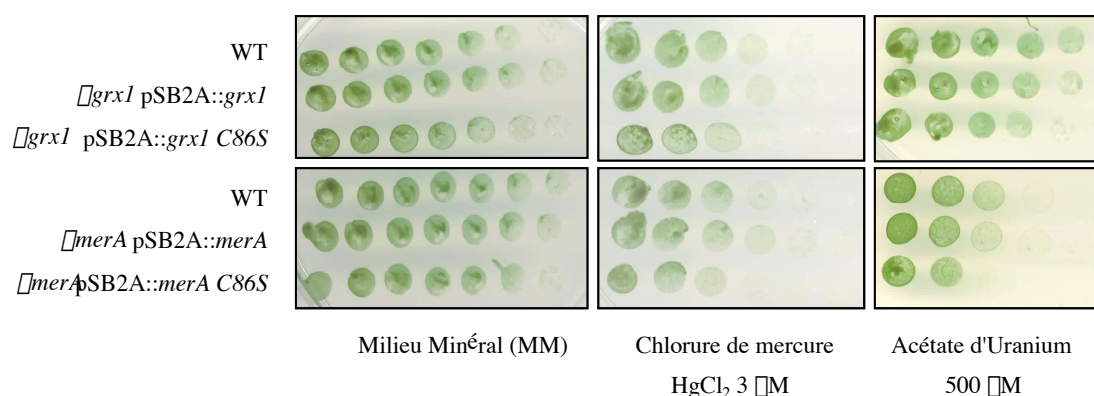
Grx1 et MerA sont donc impliquées dans la tolérance de *Synechocystis* au mercure et à l'uranium. Sachant, dans le cas de la réduction du mercure, que MerA en ai l'effecteur et Grx1 son activateur, j'ai émis l'hypothèse que leur interaction pouvait avoir le même rôle en réponse à l'uranium.

Afin de confirmer le rôle de leur partenariat dans ces mécanismes de résistance, mis en évidence *in vitro*, j'ai réalisé des tests de complémentation des mutants d'inactivation sur des milieux contenant du chlorure de mercure ou de l'acétate d'uranyle.

## 2. La cystéine 78 de MerA et la cystéine 86 de Grx1 sont importantes pour les fonctions de chaque protéine *in vivo*

Les tests de complémentation des mutants d'inactivation sont réalisés en exprimant les gènes ( $\Delta grx1$  ou  $\Delta merA$ ) dans les mutants de délétion correspondants. Pour cela j'ai cloné les gènes sauvages de Grx1 et de MerA ainsi que leurs promoteurs respectifs dans le plasmide pSB2A. De la même façon, j'ai cloné les gènes correspondants aux protéines mutantes Grx1C86S et MerAC78S. J'ai introduit par conjugaison les plasmides pSB2A::*grx1* et pSB2A::*grx1*C86S dans le mutant  $\Delta grx1$  et les plasmides pSB2A::*merA* et pSB2A::*merA*C78S dans le mutant  $\Delta merA$ .

J'ai testé la sensibilité au chlorure de mercure et à l'acétate d'uranyle des différentes souches. Les résultats de cette expérience sont présentés en Figure 51.



**Figure 51 : Les résidus cystéine 78 de MerA et cystéine 86 de Grx1 sont impliqués dans la tolérance au chlorure de mercure et à l'acétate d'uranyle.** MM : milieu minéral. Ces tests en goutte ont été réalisés à partir de culture en phase exponentielle de croissance (DO=0,5).

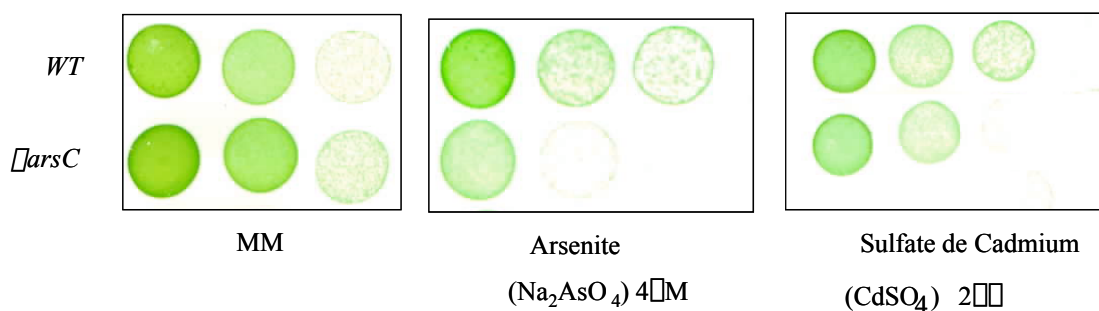
Nous observons tout d'abord que les souches  $\Delta grx1$  et  $\Delta merA$  possédant respectivement les plasmides pSB2A::*grx1* et pSB2A::*merA* se comportent comme la souche sauvage sur des milieux contenant du chlorure de mercure ou de l'acétate d'uranyle.

J'ai ensuite testé le rôle des résidus cystéine 86 de Grx1 et cystéine 78 de MerA dans la tolérance au chlorure de mercure et à l'acétate d'uranyle. Comme le montre la Figure 51, les souches mutantes  $\Delta grx1$  pSB2A::*grx1*C86S et  $\Delta merA$  pSB2A::*merA*C78S sont plus sensibles que la souche sauvage à ces toxiques. Ces résidus, impliqués dans l'interaction entre ces deux protéines, sont impliqués dans la tolérance au chlorure de mercure et à l'acétate d'uranyle.

### III. ArsC intervient dans la tolérance au cadmium

Afin de comprendre le rôle d'ArsC dans la réponse de *Synechocystis* aux stress métalliques, j'ai inactivé le gène chromosomique *arsC* (*slr0946*) (Tableau 13). Ce gène n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire puisque toutes les copies de chromosomes sauvages ont pu être éliminées.

J'ai testé ce mutant en présence de différents oxydes de métaux. Les résultats sont présentés en Figure 52. J'ai tout d'abord observé que le mutant  $\Delta arsC$  se comportait comme la souche sauvage en condition standard (MM). Le mutant inactivé est hypersensible à l'arsénite ( $Na_2AsO_4$ ) et au sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ).

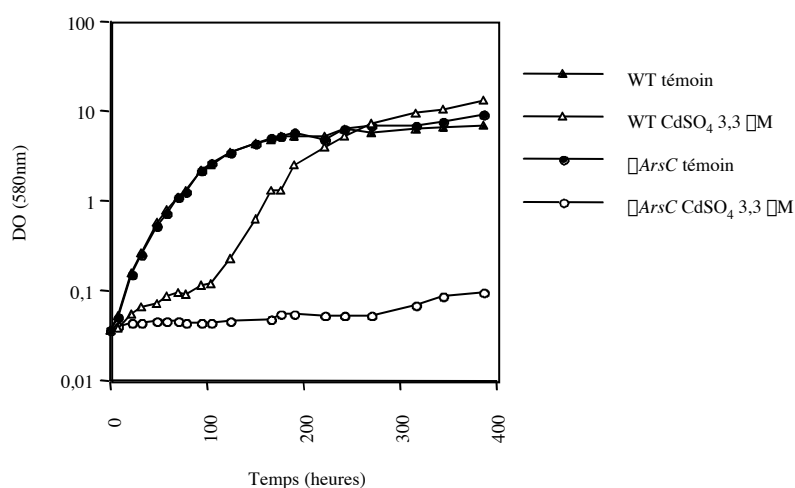


**Figure 52 : Le mutant  $\Delta arsC$  est plus sensible que la souche sauvage au sulfate de cadmium et à l'arsénite.** MM : milieu minéral. Ces tests en goutte ont été réalisés à partir de culture en phase exponentielle de croissance (DO=0,5).

Je n'ai pas testé la sensibilité du mutant  $\Delta arsC$  à l'arsenate ( $AsO_3$ ) car ce métal n'est pas toxique, aux limites de sa solubilité, pour la souche sauvage de *Synechocystis*. La sensibilité de  $\Delta arsC$  à l'arsénite n'avait jamais été mise en évidence. Pour expliquer cette sensibilité, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'arsénite peut être oxydé en arsenate dans le milieu de culture et pénétrer ensuite dans *Synechocystis*. L'arsenate est moins toxique que l'arsénite mais pénètre plus facilement dans les organismes vivants, via les transporteurs à phosphate [259].

La sensibilité du mutant  $\Delta arsC$  au sulfate de cadmium a par ailleurs été observée dans une culture liquide. Cette expérience m'a permis de comparer les vitesses de croissance de la souche sauvage et du mutant  $\Delta arsC$  (Figure 53). Dans cette expérience, réalisée en duplicat, le mutant  $\Delta arsC$  ne croit pas en présence d'une concentration de  $3,3 \mu mol.L^{-1}$  de sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ) alors que la souche sauvage atteint une phase stationnaire après 200 h de

culture (le cadmium provoque ici un retard de croissance par rapport au témoin). Cette expérience confirme bien le rôle de *ArsC* dans la tolérance de *Synechocystis* au sulfate cadmium. Une analyse transcriptionnelle a par ailleurs mis en évidence l'induction de l'ensemble de l'opéron *Ars* en présence de cadmium (article I Houot *et al*). Ce résultat est novateur et remet en cause la spécificité de l'arsenate réductase pour l'arsenic. Le rôle biologique de cette protéine n'est certainement que partiellement connu. La caractérisation d'une souche hypersensible pourrait servir de biomarqueur en milieu aqueux.



**Figure 53 : Croissances de la souche sauvage et du mutant  $\Delta arsC$  en présence de sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ). (Article Houot *et col.*). Cette expérience a été réalisée en duplicat sur des souches en phase exponentielle de croissance.**

## Chapitre III Identification et analyse d'une nouvelle voie rédox TR-Grx1-Grx2 impliquée dans la détoxification du sélénate

Les glutarédoxines sont connues pour utiliser le pouvoir réducteur du glutathion réduit (GSH) [91]. Cependant, l'absence d'activité glutathion réductase chez *Synechocystis* ainsi que les interactions que nous avons mises en évidence entre la thiorédoxine réductase et Grx1, d'une part, et entre la thiorédoxine réductase et Grx3 (Figure 41) pose la question du mode de réduction des glutarédoxines.

Pour répondre à cette question et afin de poursuivre l'analyse de la spécificité des glutarédoxines, je vais caractériser les interactions thiorédoxine réductase (TR)-Grx1 et Grx1-Grx2 en mettant en évidence leur fonction biologique et leur implication dans la tolérance au stress rédox.

### I. Grx1 interagit avec la thiorédoxine réductase (TR) et avec Grx2

A l'aide du système double hybride décrit précédemment, j'ai pu montrer que Grx1 et Grx3, mais pas Grx2, peuvent interagir avec la thiorédoxine réductase (TR). Des dosages de l'activité  $\beta$ -gal sont réalisés sur les clones correspondants aux différentes interactions testées. Pour chaque test deux clones issus de deux tests distincts ont été analysés et les dosages  $\beta$ -gal ont été répétés trois fois.

Gènes clonés dans le plasmide testeur pKT25	Gènes clonés dans le plasmide testeur pUT18				
	vide	<i>grx1</i> <i>slr1562</i>	<i>grx2</i> <i>ssr2061</i>	<i>grx3</i> <i>slr1846</i>	<i>tr</i> <i>slr0600</i>
vide	80 ± 4	78 ± 13	97 ± 12	82 ± 17	105 ± 11
<i>grx1</i>	42 ± 9	95 ± 15	<b>2 476 ± 132</b>	68 ± 8	<b>2177 ± 159</b>
<i>grx2</i>	69 ± 16	88 ± 28	110 ± 21	51 ± 13	75 ± 14
<i>grx3</i>	67 ± 8	56 ± 5	108 ± 29	75 ± 6	<b>1857 ± 243</b>
<i>tr</i>	74 ± 12	<b>2212 ± 149</b>	78 ± 13	<b>1456 ± 128</b>	92 ± 15

**Figure 54 : La thiorédoxine réductase interagit avec Grx1 et Grx3, pas avec Grx2. Grx1 et Grx2 interagissent ensemble.** Activités  $\beta$ -gal (nmol d'ONPG.min<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup>) des différents tests d'interactions. Les valeurs correspondant à des tests positifs sont figurées en gras.

Les interactions TR-Grx1 et TR-Grx3 sont validées dans les deux tests complémentaires (pUT18-*a* contre pKT25-*b* et pUT18-*a* contre pKT25-*b*). Par contre, l'interaction Grx1-Grx2

n'est observée que dans le sens de tests pUT18::*grx2* avec pKT25::*grx1*. Tous les autres tests impliquant des glutarédoxines entre elles sont négatifs (Figure 54). Concernant l'interaction de la thiorédoxine réductase avec les glutarédoxines, j'ai pu observer des interactions positives dans les deux sens de test possibles (pUT18-*a* contre pKT25-*b* et pUT18-*b* contre pKT25-*a*) entre, d'une part, Grx1 et TR et, d'autre part, entre Grx3 et TR (Figure 54). Cette observation renforce d'autant plus la validité de ces résultats. Le fait de n'observer une interaction que dans un sens de test peut être dû à la non fonctionnalité d'une fusion avec une des sous unités de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*. En effet, le clonage dans le plasmide pUT18 entraîne la fusion en N-terminal de la protéine avec le domaine T18 de l'adénylate cyclase. Le clonage dans le plasmide pKT25 entraîne la fusion en C-terminal de la protéine avec le domaine T25 de l'adénylate cyclase (voir Matériel et Méthodes). Dans ces deux constructions, des domaines différents de la protéine analysée peuvent être encombrés par la fusion obtenue.

Afin de confirmer et d'analyser ces interactions, j'ai réalisé la mutagenèse dirigée de ces protéines. J'ai émis l'hypothèse d'interactions de type rédox ou électrostatique et je me suis focalisé sur l'analyse du rôle des sites actifs disulfures, et par extension de l'ensemble des cystéines de ces protéines (dans la recherche d'éventuels mécanismes d'oxydoréduction originaux) ainsi que sur les acides aminés chargés conservés.

## II. Rôle des cystéines de Grx1, Grx2 et TR

### A. Analyse de l'interaction Grx1 – TR par mutagenèse dirigée

Le rôle des cystéines de Grx1 et de TR dans l'interaction Grx1-Tr a été analysé par mutagenèse dirigée (Figure 55). J'ai changé systématiquement les cystéines (C) en sérine (S) afin de conserver l'environnement physico-chimique tout en remplaçant le thiol réactif (-SH) par un groupe hydroxyl (-OH) (ne pouvant plus former de pont disulfure). Les sites fonctionnels (site de fixation du FAD et site de fixation du NADPH : GXGXGG) de TR sont situés dans la partie N-terminale (pour revue voir [260]). Outre les deux cystéines du site actif disulfure (cystéine 153 et cystéine 156), la cystéine C-terminale (cystéine 197) pourrait directement interagir avec le substrat, comme cela a été observé pour la thiorédoxine réductase humaine [261]. Par contre, son état rédox est contrôlé par le site actif de type CXXC de cette même protéine (formation de ponts disulfures intramoléculaires).

Grx1 possède deux cystéines dans son site actif (31 et 34) et une cystéine dans son site de fixation du glutathion (86).

Cloné dans pUT18	Cloné dans pKT25	Dosage $\beta$ -galactosidase (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
zip	zip	4258 $\pm$ 245
vide	vide	94 $\pm$ 11
<i>tr</i>	<i>grx1</i>	2 177 $\pm$ 159
<i>tr</i>	<i>grx1</i> C31S *	1708 $\pm$ 87
<i>tr</i>	<i>grx1</i> C34S *	1887 $\pm$ 123
<i>tr</i>	<i>grx1</i> C86S ■	84 $\pm$ 9
<i>tr</i> C41S	<i>grx1</i>	2051 $\pm$ 185
<i>tr</i> C153S *	<i>grx1</i>	56 $\pm$ 8
<i>tr</i> C156S *	<i>grx1</i>	2241 $\pm$ 196
<i>tr</i> C197S	<i>grx1</i>	117 $\pm$ 15

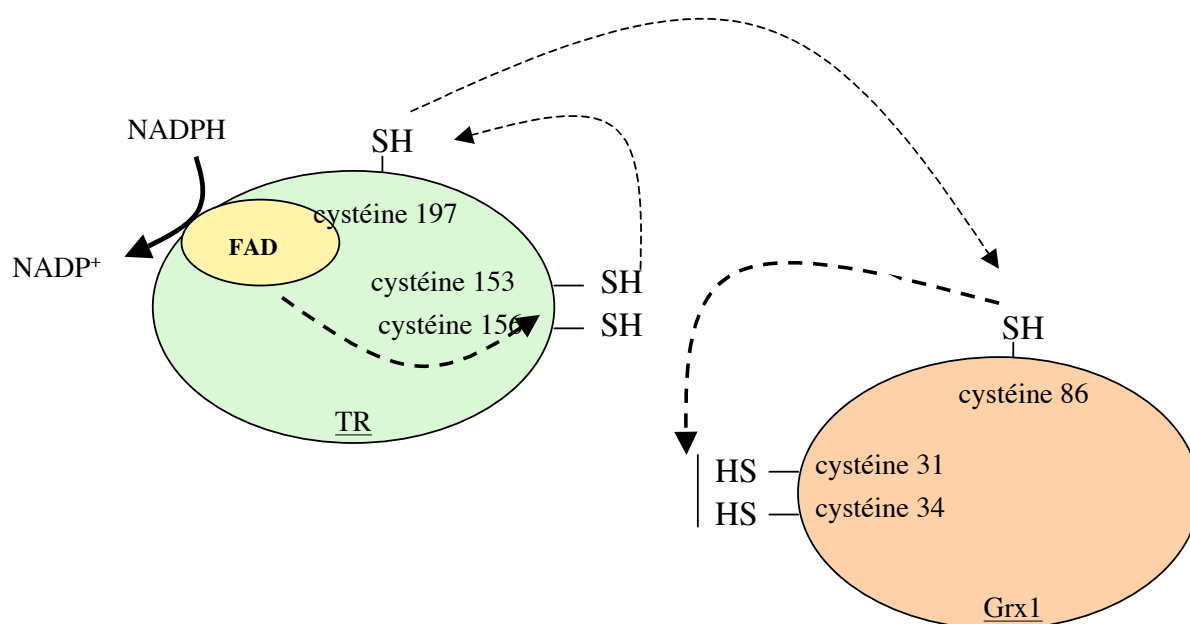
**Figure 55 : Etude de l'interaction TR-Grx1 par mutagenèse dirigée.** Activités  $\beta$ -gal (nmol d'ONPG.min<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup>) correspondant aux différents tests d'interactions. Les tests zip/zip et vide/vide sont les témoins positif et négatif. Les cystéines impliquées dans les sites actifs de Grx1 et de TR sont indiquées par un astérisque (\*). La cystéine de Grx1 impliquée dans le site de fixation du glutathion est indiquée par un carré bleu (■). Les valeurs correspondant à des tests positifs sont figurées en gras.

Grâce à la mutagenèse ciblée (Figure 55), j'ai pu montrer le rôle majeur de la cystéine 86 de Grx1 (située dans le site de fixation du glutathion). En effet, si ce résidu est remplacé par une sérine, l'interaction avec TR est abolie (84  $\pm$  9). Les deux cystéines impliquées dans le site actif (cystéine 31, cystéine 34) de Grx1 n'interviennent pas directement dans l'interaction avec TR (pas de différence d'activité  $\beta$ -galactosidase).

De la même manière, j'ai pu montrer que la cystéine N-terminale du site actif de TR (cystéine 153) est nécessaire à l'interaction avec Grx1 (56  $\pm$  8). La cystéine 197 est également importante pour cette interaction (117  $\pm$  15). Contrairement à Grx1, le site actif de TR est donc directement impliqué dans cette interaction, le rôle de la cystéine 197 est inconnu.



D'après le modèle de Gromer *et col.*, précédemment décrit, la cystéine 197 de TR pourrait être une cystéine d'interaction, son état rédox étant sous le contrôle du site actif. L'état rédox de la cystéine 86 de Grx1 pourrait être contrôlé par TR via cette cystéine 197. Une transmission des électrons de la cystéine 86 vers le site actif de Grx1 se ferait dans un deuxième temps. (Figure 56).



**Figure 56 : Modélisation de l'interaction entre TR et Grx1.** TR : thiorédoxine réductase, Grx1 : glutarédoxine 1. Les flèches en pointillé indiquent les transferts d'électrons supposés

## B. Analyse de l'interaction Grx2 - Grx1 par mutagenèse dirigée

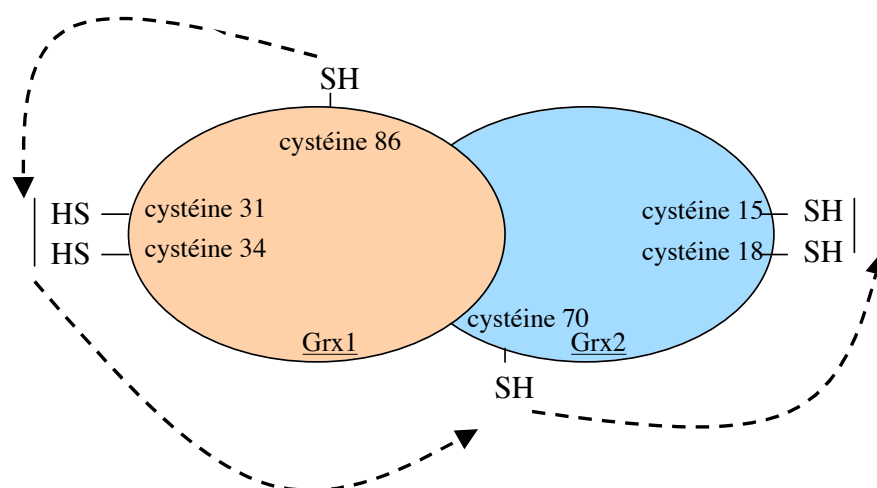
J'ai analysé les interactions entre Grx1 et Grx2 avec la même stratégie. Les résultats de la mutagenèse de ces deux enzymes sont présentés en Figure 57.

Cloné dans pUT18	Cloné dans pKT25	Dosage $\beta$ -galactosidase (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
zip	zip	4258 $\pm$ 245
vide	vide	94 $\pm$ 11
<b><i>grx2</i></b>	<b><i>grx1</i></b>	<b>2 476 <math>\pm</math> 132</b>
<b><i>grx2</i></b>	<b><i>grx1</i> C31S *</b>	<b>810 <math>\pm</math> 35</b>
<i>grx2</i>	<i>grx1</i> C34S *	86 $\pm$ 8
<i>grx2</i>	<i>grx1</i> C86S ■	96 $\pm$ 21
<b><i>grx2</i> C15S*</b>	<b><i>grx1</i></b>	<b>2134 <math>\pm</math> 251</b>
<b><i>grx2</i> C18S*</b>	<b><i>grx1</i></b>	<b>1876 <math>\pm</math> 123</b>
<i>grx2</i> C36S	<i>grx1</i>	40 $\pm$ 12
<i>grx2</i> C70S ■	<i>grx1</i>	<b>1980 <math>\pm</math> 145</b>

**Figure 57 : Les cystéines (31 et 34) du site actif et la cystéine 86 de Grx1 sont impliquées dans l'interaction avec Grx2.** Une cystéine supplémentaire (cystéine 36) de Grx2 est impliquée dans cette interaction. Activités  $\beta$ -gal (nmol d'ONPG.min<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup>) correspondant aux différents tests d'interactions. Les tests zip/zip et vide/vide sont les témoins positif et négatif. Les cystéines impliquées dans les sites actifs de Grx1 et de TR sont indiquées par un astérisque (\*). La cystéine de Grx1 impliquée dans le site de fixation du glutathion est indiquée par un carré bleu (■). Les valeurs correspondant à des tests positifs sont figurées en gras.

La cystéine C-terminale (34) du site actif de Grx1 et la cystéine 86 sont importantes pour l'interaction avec Grx2. Dans le cas de Grx2, seule la cystéine 36, située en dehors du site actif (C15XXC18), est nécessaire à l'interaction avec Grx1. Cette cystéine n'est pas située dans le site de fixation du glutathion. Elle est spécifique à Grx2 (absente de Grx1).

Nous pouvons émettre ici l'hypothèse que l'état redox de la cystéine 36 de Grx2 est sous le contrôle de Grx1 via son site actif (dont l'état redox serait lui-même sous le contrôle de sa cystéine 86, interagissant avec le glutathion ou avec TR). La réduction du site actif de Grx2 se ferait dans un deuxième temps, intramoléculairement via la cystéine 70 (Figure 58).



**Figure 58 : Modélisation de l'interaction entre Grx1 et Grx2.** Grx1 : glutarédoxine 1, Grx2 : glutarédoxine 2. Les flèches en pointillé indiquent les transferts d'électrons supposés.

### III. Validation *in vitro* des interactions TR-Grx1-Grx2, implication dans la détoxification du sélénate

J'ai analysé *in vitro* l'activité des différents partenaires dont les interactions ont été observées avec le test double hybride et confirmées à la mutagenèse dirigée. Pour cela, j'ai d'abord surproduit et purifié les protéines Grx1, Grx2 et TR et j'ai réalisé des tests d'activité en présence d'un agent réducteur (NADPH) et d'un substrat oxydé.

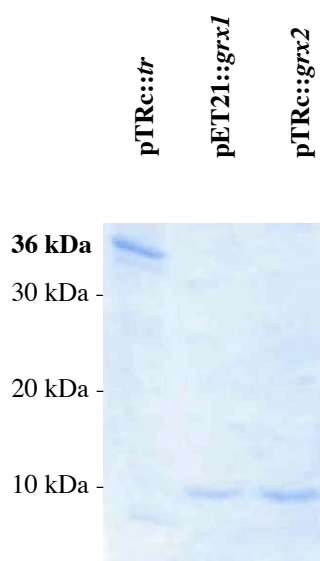
#### A. Construction et purification des protéines TR, Grx1 et Grx2 fusionnées à une étiquette 6xHis

J'ai réalisé ces fusions en C-terminal dans les plasmides de fusion pTRc (TR et Grx2) et PQE31 (Grx1), et en N-terminal dans le plasmide pET21 (Grx1).

Les trois fusions (His-Grx1, Grx2-His et TR-His) ont été surproduites (voir Matériel et Méthodes). Le Tag histidine est fusionné en C-terminal sur Grx1. La surproduction de la

protéine de fusion Grx1-His (réalisée dans le pQE31, fusion du Tag histidine en C-terminal) n'est pas fonctionnelle. Nous pouvons émettre l'hypothèse que soit l'ARN, soit la protéine de fusion produits ne sont pas stables chez *E. coli*.

Toutes les protéines (Grxs et TR) étant solubles ; leur purification a été effectuée à l'aide d'un protocole classique sur des billes de Nickel en « batch » (voir Matériel et Méthodes). Nous avons obtenu un rendement de 1 à 2 µg de protéine à partir de 200 mL de culture. La pureté des extraits obtenus est supérieure à 90% (Figure 59).

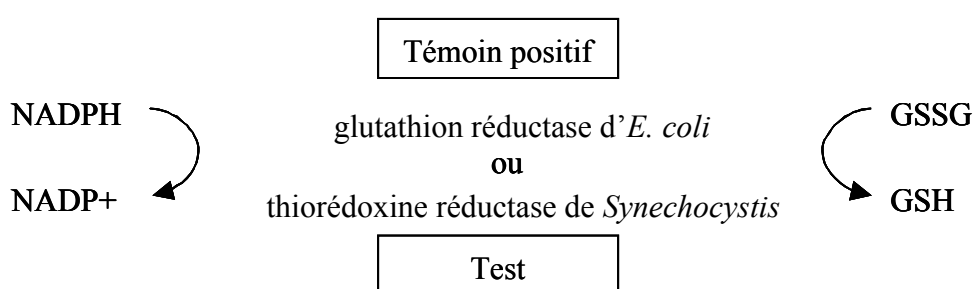


**Figure 59 : Purification de His-Grx1, Grx2-His et TR-His.** Migration sur un gel SDS page (15 %), coloration au bleu de Comassie.

## B. Mise en évidence de la cascade d'oxydoréduction TR-Grx1-Grx2

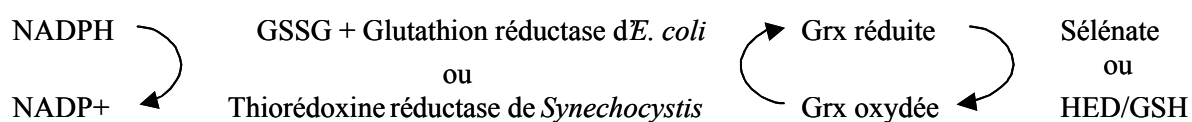
**Principe des tests d'activité.** Les tests d'activité que j'ai utilisés sont tous basés sur la consommation du NADPH par différents systèmes enzymatiques. Le NADPH absorbe à 340 nm, sa consommation entraîne une diminution de la densité optique ( $DO_{340}$ ). *A contrario*, un mélange réactionnel dont la  $DO_{340}$  n'évolue pas au cours du temps n'est pas fonctionnel.

- L'activité glutathion réductase est mesurée en présence de NADPH, de glutathion oxydé (GSSG) et de la protéine dont on veut tester l'activité (Figure 60). Ce test ne mesure que les activités glutathion réductase dépendantes du NADPH.

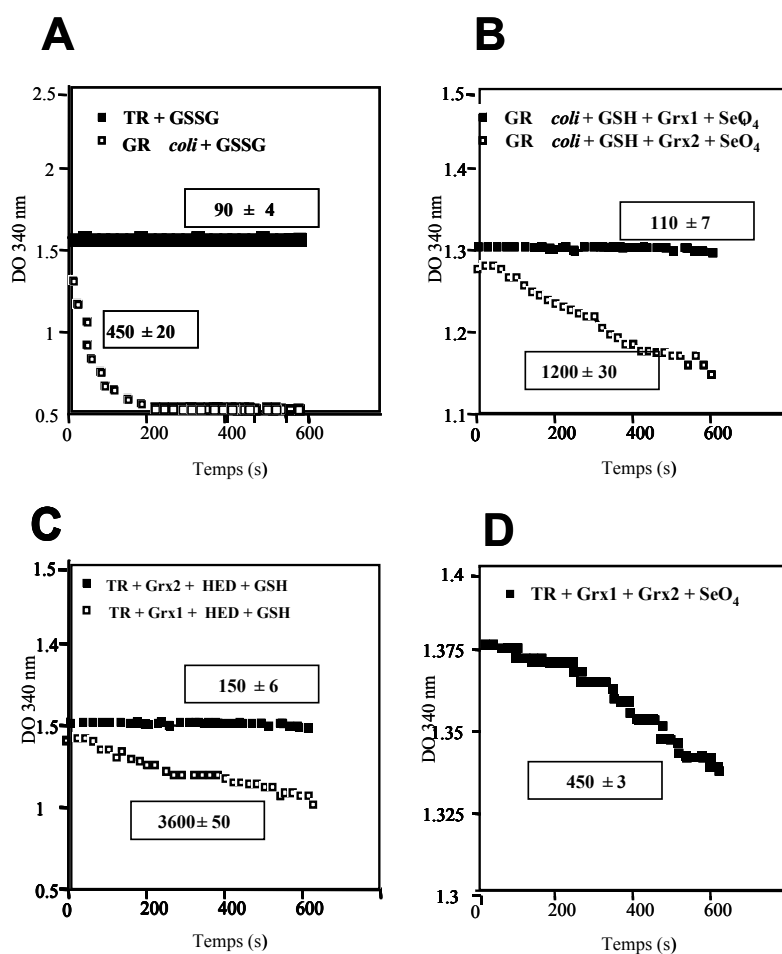


**Figure 60 : Principe du test d'activité glutathion réductase.** D'après [262].

- L'activité glutarédoxine est mesurée en présence de NADPH, du couple GR d'*E. coli* / glutathion oxydé (GSSG) ou de la thiorédoxine réductase de *Synechocystis*, et d'un des deux substrats des glutarédoxines : le sélénate (d'après [263]) ou le mélange HED/GSH (ces deux composés ont la propriété de former un pont disulfure intermoléculaire [152])) (Figure 61).



**Figure 61 : Principe du test d'activité des glutarédoxines.** D'après [264].

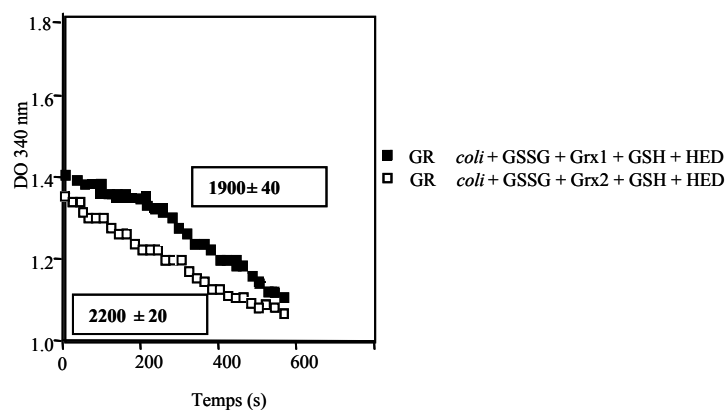


Activité spécifique (nmol NADPH. min<sup>-1</sup>.mg protéine<sup>-1</sup>)

**Figure 62 : Mise en évidence de la réduction de Grx2 par Grx1 et de Grx1 par TR.** GSSG : glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit, GR *coli*: glutathion réductase d'*E. coli*, TR : thiorédoxine réductase de *Synechocystis*, Grx1 : glutarédoxine 1, Grx2 : glutarédoxine 2, HED : hydroxyethylsulfide, SeO<sub>4</sub> : sélénate. Les concentrations des réactifs utilisés sont les suivantes : NADPH (1 mM), GSSG (1 mM) GR *E. coli* et TR *Synechocystis* (0,5 μM), Grx1 et Grx2 (0,5 μM), GSH (1 mM), HED (0,7 mM) et sélénate (5 mM). Les valeurs encadrées correspondent aux activités spécifiques mesurées (en nmol de NADPH oxydé.min<sup>-1</sup>.mg de protéines<sup>-1</sup>).

**Résultats.** Les résultats de ces dosages sont présentés en Figure 63 et Figure 62.

J'ai tout d'abord montré que les deux glutarédoxines à dithiol (Grx1 et Grx2) de *Synechocystis* sont fonctionnelles en présence de la GR d'*E. coli*, de GSSG et d'un mélange d'hydroxyethyldisulfide (HED) et de GSH (Figure 63).



Activité spécifique en  $\mu\text{mol}^{-1} \text{NADPH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéine}^{-1}$

**Figure 63 : Mise en évidence *in vitro* de l'activité des glutarédoxines Grx1 et Grx2 de *Synechocystis*.** Test réalisé en présence de GR d'*E. coli* et de glutathion oxydé (GSSG), et d'un mélange de GSH + HED. Les concentrations des réactifs utilisés sont les suivantes : NADPH (1 mM), GSSG (1 mM) GR *E. coli* (0,5  $\mu\text{M}$ ), Grx1 et Grx2 (0,5  $\mu\text{M}$ ), GSH (1 mM), HED (0,7 mM). Les valeurs encadrées correspondent aux activités spécifiques mesurées (en  $\mu\text{mol}$  de NADPH oxydé. $\text{min}^{-1}$ .mg de protéines $^{-1}$ ).

J'ai ensuite confirmé que TR de *Synechocystis* ne possède pas d'activité glutathion réductase en présence de NADPH et de glutathion oxydé (GSSG) (pas de consommation du NADPH) (Figure 62 A). TR de *Synechocystis* ne se comporte donc pas comme la thiorédoxine réductase de *Drosophila Melanogaster* [109] (voir Introduction).

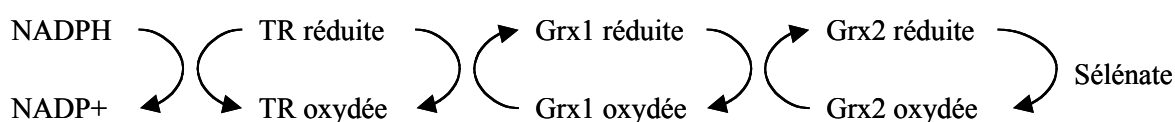
Grx1 et Grx2 ont une activité glutarédoxine. J'ai testé cette activité en substituant le mélange HED+GSH par un autre substrat des glutarédoxines : le sélénate ( $\text{SeO}_4$ ) [263]. Ce test m'a permis de mettre en évidence la spécificité de substrat de Grx2 pour le sélénate, Grx1 n'est pas capable de le réduire (pas de consommation du NADPH) (Figure 62 B).

Afin de confirmer l'interaction observée en double hybride et analysée par mutagenèse dirigée entre TR et Grx1, j'ai mis ces deux protéines en présence de NADPH (utilisable par TR) et du mélange (HED + GSSG) (substrat de Grx1). On observe une décroissance de la  $\text{DO}_{340}$  et donc une consommation du NADPH. TR est donc capable d'utiliser le pouvoir réducteur du NADPH pour réduire Grx1. Cette réaction est spécifique, puisqu'elle n'est pas

observée en présence de Grx2 (Figure 62 C).

Je me suis ensuite basé sur la spécificité de réduction du sélénate par Grx2 (pas Grx1) et sur la spécificité de réduction de Grx1 (pas Grx2) par TR pour analyser l'interaction entre Grx1 et Grx2. La Figure 62 D montre le résultat d'un test dans lequel TR, Grx1 et Grx2 sont mis en présence de sélénate et de NADPH. On observe une baisse de la  $DO_{340}$  au cours du temps et donc une baisse de la concentration du NADPH. Sachant que 1) TR ne peut réduire que Grx1, pas Grx2 et que 2) Grx2 peut réduire le  $SeO_4$ , pas Grx1 alors l'activation de la cascade rédox impliquant TR, Grx1 et Grx2 en présence de NADPH et de  $SeO_4$  nous permet de conclure que Grx2 est réduite par Grx1 (Figure 62 D).

Cette cascade de réactions est schématisée en Figure 64.



**Figure 64 : Bilan de la cascade d'interaction TR-Grx1-Grx2 aboutissant à la réduction du sélénate.**

Pour analyser ce système rédox *in vivo*, j'ai réalisé les protéines de fusion de Grx1 et Grx2 avec un épitope Myc (voir Matériel et Méthodes). Cet épitope permet de visualiser (et de quantifier) par Western Blot les protéines auxquelles ils sont fusionnés en fonction des différentes conditions de culture et d'analyser les modifications de l'état rédox de ces protéines. Nous aurions pu utiliser les mêmes protéines fusionnées à des étiquettes 6xHis, mais les anticorps anti-6xHis sont moins spécifiques (pouvant réagir avec des protéines naturellement riches en cystéines).

Dans cette étude, ces constructions m'ont permis d'analyser le comportement de Grx1 et de Grx2 en réponse au sélénate de sodium ( $Na_2SO_4$ ) dans le milieu de culture. Cet oxyde de sélénium est un substrat des glutarédoxines, et plus particulièrement de Grx2 de *Synechocystis* (voir précédemment). Par ailleurs, nous avons montré que la souche mutante  $\Delta grx2$  est sensible au sélénate de sodium ( $Na_2SO_4$ ) (voir Chapitre I de la partie Résultats).



## IV. Régulation *in vivo* de Grx1 et Grx2 en réponse au sélénate

### A. Constructions des fusions myc-Grx1 et Grx2-myc

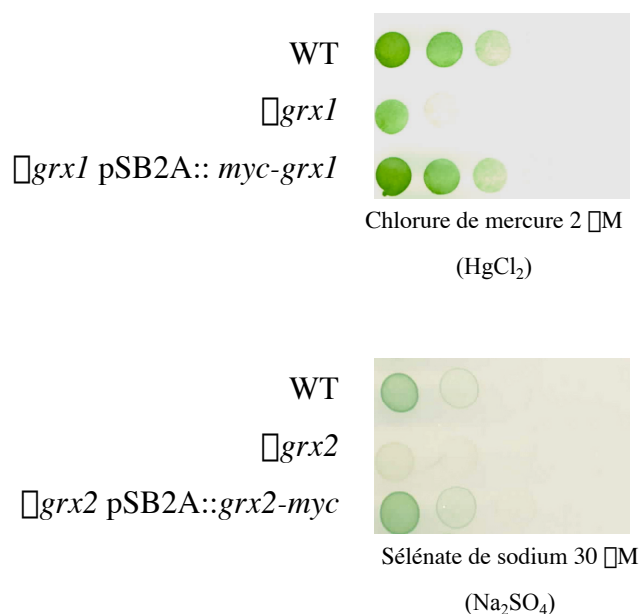
Afin d'optimiser l'expression de ces fusions, je me suis basé sur les résultats obtenus lors de la fusion de ces glutarédoxines avec des Tags Histidine (voir précédemment). Les fusions ont été réalisées par PCR à l'aide d'oligonucléotides adéquats (voir Matériel et Méthodes). Les Tags épitopiques sont composés d'un Myc (dont la séquence est EQKLISEEDLL). J'ai donc fusionné l'épitope Myc en N-terminale pour Grx1 et en C-terminale pour Grx2, soit les constructions myc-Grx1 et Grx2-myc. Ces constructions incluent le promoteur des gènes *grx1* et *grx2* et sont clonées dans le vecteur pSB2A permettant leur propagation chez *Synechocystis*.

J'ai introduit les plasmides pSB2A::*myc-grx1* et pSB2A::*grx2-myc* dans *Synechocystis* par conjugaison (voir Matériel et Méthodes). Tout d'abord dans la souche sauvage (WT), dont la quantité finale de Grx1 ou de Grx2 est modifiée (multipliée par un facteur 2) car le plasmide pSB2A se réplique à raison d'une copie par copie de chromosome (voir Matériel et Méthodes et [23]). Puis, j'ai introduit ces constructions dans différents contextes génétiques de *Synechocystis*, c'est-à-dire dans les mutants d'inactivation préalablement construits  $\Delta$ *grx1* et  $\Delta$ *grx2* (voir Matériel et Méthodes et Chapitre I partie II.A et). J'ai par ailleurs construit le mutant  $\Delta$ *tr* (voir Chapitre III partie V.C pour l'analyse de ce mutant) (Tableau 14).

Plasmide	Description
<b>Plasmides utilisés</b>	
pGEMt	Vecteur de clonage AT AmpR (Promega)
pFC1	Source du marqueur Cm <sup>R</sup> (Mermet-Bouvier, 1994)
<b>Plasmides hébergeant le gène codant pour la thiorédoxine réductase (TR)</b>	
pTR	pGEMt avec le gène <i>tr</i> flanqué par 300 pb en amont du codon « start » et 257 pb en aval du codon stop
<b>Construction de la cassette d'inactivation</b>	
p $\Delta$ R	pTR avec le marqueur Cm <sup>R</sup> de pFC1 inséré entre les nucléotides 9 et 317 de <i>tr</i>

Tableau 14 : Caractéristiques de la cassette d'inactivation de la thiorédoxine réductase (TR).

J'ai démontré que les fusions de Grx1 et de Grx2 avec un épitope Myc complétaient les souches délétées pour les gènes correspondants (perte de leur hypersensibilité) respectivement en présence de chlorure de mercure et de sélénate. (Figure 65). Ces résultats montrent que les protéines de fusion myc-Grx1 et Grx2-myc possèdent bien l'activité de la protéine sauvage *in vivo*.



**Figure 65 : Myc-Grx1 et Grx2-Myc sont fonctionnelles *in vivo*.** pSB2A::myc-grx1 et pSB2A::myc-grx2 complètent les mutants  $\Delta grx1$  et  $\Delta grx2$  en chlorure de mercure et en sélénate.

#### B. Formation d'un hétérodimère Grx1-Grx2 *in vivo*

Au cours de cette étude, j'ai mis en évidence la réduction *in vitro* du sélénate par Grx2. D'autre part, j'ai identifié et caractérisé une interaction entre Grx1 et Grx2. J'ai donc cherché à caractériser *in vivo* le comportement de ces protéines en présence de sélénate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

J'ai observé la quantité de Grx1 et de Grx2 en réponse à une exposition à 400 μM de sélénate pendant 0, 15 et 30 min. Pour chaque dose-réponse, 200 mL de culture de la souche analysée en phase exponentielle de croissance (DO=0,5) ont été utilisés. Après traitement, les extraits protéiques solubles sont séparés par électrophorèse. Des gels non réducteurs ont été utilisés afin de visualiser d'éventuels ponts disulfures entre Grx1 et Grx2. En effet, l'interaction de ces deux protéines implique des cystéines (cystéines 34 et 86 de Grx1 et cystéine 36 de Grx2), nous pouvons donc supposer que celle-ci pourrait prendre la forme d'un pont disulfure.



Le « Western blot » a été réalisé à l'aide d'anticorps primaires « anti-myc » (d'origine murine) détectant directement les épitopes Myc fusionnés aux protéines. Puis, un anticorps secondaire « anti-souris » (pouvant détecter l'anticorps primaire produit chez la souris), couplé à une peroxydase, a été utilisé. La peroxydase catalyse la réaction enzymatique de révélation (voir Matériel et Méthodes) dont l'intensité sera corrélée à l'abondance de la protéine fusionnée présente dans l'extrait. Les résultats sont présentés en Figure 66.

Dans des conditions de migration non réductrices, la révélation des protéines étiquetées myc-Grx1 et Grx2-myc fait apparaître une bande à 21 kDa dans la souche sauvage (WT) . Cette bande est toutefois plus intense lorsque Grx2-myc est révélée. L'intensité de la bande est corrélée au temps d'exposition au sélénate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (entre 15 et 30 minutes). La taille de cette bande ( $21=12+9$ ), obtenue en révélant à l'aide de l'anticorps anti-myc sur des extraits contenant les protéines Myc-grx1 ou Grx2-myc, permet de faire l'hypothèse qu'il y a formation d'un hétérodimère Grx1-Grx2.

Cette bande n'est pas visible dans les extraits cellulaires issus des souches  $\Delta\text{grx2}$  et  $\Delta\text{tr}$  pour myc-Grx1 et  $\Delta\text{grx1}$  et  $\Delta\text{tr}$  pour Grx2-myc. Dans ces extraits, nous n'observons aucun signal. D'un point de vue expérimental, cela peut signifier que la quantité de Myc que j'ai fusionnée à Grx1 et Grx2 est trop faible (un doublement de leur quantité aurait doublé l'intensité du signal, qui aurait peut-être été visible). Cela peut être confirmé par le fait qu'on ne voit pas non plus de signal pour Myc-grx1 dans le contexte sauvage en conditions non dénaturantes à  $t = 0$  (quantité trop faible), ni d'ailleurs pour Grx2-myc dans le même contexte à  $t = 0$  et 15 min. Nous sommes ici à la limite de détection du système. L'absence de bande correspondant aux glutarédoxines monomériques dans les différents extraits cellulaires issus des souches  $\Delta\text{grx1}$ ,  $\Delta\text{grx2}$  et  $\Delta\text{tr}$  pourrait aussi signifier que ces enzymes ne sont pas exprimées ou stabilisées en réponse au sélénate de sodium en l'absence de complexe hétérodimérique. L'absence de TR ne permettrait pas la formation d'un complexe Grx1-Grx2.

Les formes monomériques de Grx1 et de Grx2 étiquetées à un épitope Myc migrent à des poids moléculaires respectifs d'environ 12 et 9 kDa. Ces deux protéines sont produites dans la souche sauvage (WT) après une exposition de 400  $\mu\text{M}$  de sélénate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) pendant 30 minutes (Figure 66, migration en conditions réductrices, à droite).

Pour confirmer l'existence d'un hétérodimère Grx1-Grx2, la même expérience devra être

réalisée en co-exprimant Grx1 et Grx2 avec des épitopes différents (Myc et HA par exemple) afin d'identifier les deux protéines sur un même extrait protéique. Dans cette expérience, il sera alors possible de montrer l'influence des mutations de cystéines impliquées dans l'interaction de ces deux glutarédoxines (cystéines 34 et 86 de Grx1 et cystéine 36 de Grx2).

Avant cette étude, seule l'existence d'un homodimère de glutarédoxine (Grx C4 de *Populus tremula* (peuplier)) a été observée en structure RMN [265]. Ici, pour la première fois, nous semblons montrer que des hétérodimères de glutarédoxines sont susceptibles de se former *in vivo*.

## V. La thiorédoxine réductase a un rôle clef chez *Synechocystis*

### A. Absence de $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase (GshA)

Comme cela a été décrit dans l'Introduction (Chapitre III, partie II), la synthèse du glutathion nécessite deux réactions successives catalysées par deux enzymes : la  $\gamma$ -glutamylcysteine synthétase (GshA) et la glutathion synthase (GshB).

Dans le génome de *Synechocystis*, une séquence codant pour GshB est identifiée dans la base de données CYANOBASE : il s'agit de la séquence *slr1238*. Cette enzyme a une séquence très homologue à celle de la GshB d'*E.coli*.

En revanche, la recherche d'homologies de séquences de la GshA d'*E. coli* (BLASTP) ne donne aucun résultat ni chez *Synechocystis* ni chez les autres cyanobactéries dont le génome a été séquencé (dont *Anabaena* sp. PCC 7120, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, *Synechococcus* sp. WH 8102). Par contre, j'ai identifié une protéine appartenant à la famille des glutamate-cysteine ligase, n'ayant pas de fonction connue. Cette protéine, codée par la séquence *slr0990*, est conservée chez les cyanobactéries et chez *A. thaliana* (At5g47400, 34 % d'identité). Son activité glutamylcystéine synthétase devra être testée.

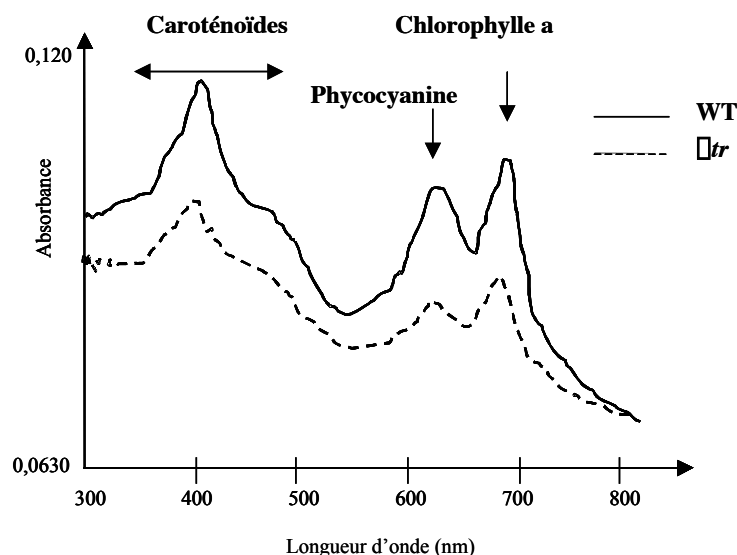


inconnu. De nouvelles voies métaboliques restent donc à être mises en évidence.

### C. TR est essentielle à la viabilité cellulaire de *Synechocystis*

Dans des conditions standard de croissance, même en présence de 10  $\mu$ g/mL de chloramphénicol et plus de 100 générations, il n'a pas été possible d'éliminer toutes les copies de *tr* sauvage (l'analyse par PCR des mutants montre qu'au moins 50% des copies sauvages sont encore présentes). Le mutant inactivé partiellement a un temps de génération 2,5 fois supérieur à celui de la souche sauvage (temps de génération de 25 h).

Il possède un contenu pigmentaire altéré en comparaison avec celui de la souche sauvage. La souche a une couleur jaune-vert alors que la souche sauvage (WT) a une couleur verte. La perturbation du profil d'absorption du mutant  $\Delta tr$  est illustrée Figure 69.



**Figure 69 : L'absence de *tr* modifie le contenu pigmentaire de *Synechocystis*.** Spectres d'absorption des souches  $\Delta tr$  et sauvage en conditions standard. Les souches sont à une DO=0,5 correspondant au milieu de la phase exponentielle de croissance.

Nous observons une diminution de la quantité de l'ensemble des pigments (caroténoïdes, chlorophylle et phycocyanine). Cette altération est plus marquée que celle due à l'absence de Grx3 (voir Chapitre I partie II.B). La fonction de TR et celle de Grx3 sont certainement liées, directement ou indirectement, au fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Nous pouvons émettre l'hypothèse que TR intervient dans l'abondance des pigments photosynthétiques. Cette hypothèse est renforcée par l'étude réalisée par Lindahl et col. Montrant que les thiorédoxines ont pour partenaires différents pigments comme la

phycocyanine ou les phycobilisomes. L'absence de TR pourrait fortement perturber le fonctionnement des thiorédoxines et par extension celui des pigments [266].

Ces résultats traduisent de l'importance de TR dans le fonctionnement du système de contrôle de l'homéostasie des thiols. En son absence, nous pouvons émettre l'hypothèse que la réduction des systèmes glutarédoxine et thiorédoxine peut être perturbée. Nous pouvons supposer que la prise en charge du stress oxydant lié au fonctionnement normal de la cellule (photosynthèse et respiration) n'est plus assurée par ces voies métaboliques.



## **CONCLUSION, PERSPECTIVES**

Le maintien de l'homéostasie rédox des thiols, dépendant du pouvoir réducteur du NADPH, est un processus vital pour la cellule faisant intervenir deux voies supposées distinctes : 1) thiorédoxine réductase/thiorédoxines et 2) glutathion réductase/glutathion/glutarédoxines. Bien que ces deux voies rédox soient très étudiées chez les organismes hétérotrophes modèles *E. coli* et *S. cerevisiae*, on comprend encore mal la spécificité des glutarédoxines et des thiorédoxines. Notre ignorance est encore plus grande dans le cas des organismes photosynthétiques, en dépit du fait que leur métabolisme rédox, dépendant de la photosynthèse, est essentiel à la biosphère (renouvellement de l'atmosphère oxygénique, assimilation du carbone et de l'azote inorganiques nécessaires à la production de biomasse pour la chaîne alimentaire). Comme la respiration, la photosynthèse produit des molécules oxydantes (les espèces réactives de l'oxygène) qui perturbent l'état rédox des thiols de nombreux enzymes. Pour analyser le contrôle de l'homéostasie rédox des thiols dans les cellules photosynthétiques, le laboratoire utilise un organisme modèle: la cyanobactérie unicellulaire *Synechocystis* sp. PCC6803. Les cyanobactéries (ancêtres du chloroplaste) sont intéressantes car elles effectuent la respiration et la photosynthèse dans le cytoplasme, qui contient aussi l'ADN qui est vulnérable au stress oxydant. Ainsi confrontées à la toxicité de l'oxygène qu'elles ont elles même initialement produit, les cyanobactéries ont nécessairement développé des stratégies de tolérance au stress oxydant efficaces, dont certaines ont été conservées au cours de l'évolution, comme en témoigne le fait que de nombreuses enzymes anti-oxydantes cyanobactériennes ont des orthologues chez les plantes et les mammifères. C'est le cas des enzymes impliquées dans le contrôle de l'homéostasie des thiols: 1) thiorédoxine réductase et thiorédoxines et 2) glutathion réductase et glutarédoxines, mentionnées plus haut. L'avantage de *Synechocystis*, c'est qu'elle possède un petit génome (3.57 Mb) séquencé [18] (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) et facilement manipulable grâce aux vecteurs plasmidiques réplcatifs développés au laboratoire [23] [24] [25].

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle des glutarédoxines dans la physiologie des cellules photosynthétiques, un domaine encore mal connu [1]. D'après ce qu'on sait chez les organismes hétérotrophes, les glutarédoxines utilisent le pouvoir réducteur du glutathion (GSH, re-réduit par le NADPH via la glutathion réductase ou GOR) pour contrôler l'état rédox des thiols des résidus cystéines (Cys) des protéines (réduire les ponts disulfure inter- ou intra-moléculaires). Les glutarédoxines (Grxs) se répartissent en deux grandes familles, selon

la composition de leur centre rédox actif : les glutarédoxines à dithiol (possédant un site actif de type CysXXCys) et les glutarédoxines à monothiol (avec un site actif de type CysXXSer). *Synechocystis* possède 3 glutarédoxines : deux à dithiol (Grx1 et Grx2) et une à monothiol (Grx3), qui sont conservées chez les autres cyanobactéries dont le génome est séquencé, ainsi que chez les organismes modèles non-photosynthétiques.

Dans un premier temps, j'ai inactivé les 3 gènes *grx*, indépendamment ou non. Tous les mutants correspondants (simples, doubles et triple) sont parfaitement viables dans les conditions standard de croissance. Cependant, la croissance des mutants  $\Delta grx3$ ,  $\Delta grx1\Delta grx3$ ,  $\Delta grx2\Delta grx3$  et  $\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$  est légèrement ralentit (2 fois) par rapport à celle des autres mutants, qui eux poussent aussi vite que la souche sauvage. Collectivement, ces résultats indiquent que dans les conditions standard, où les cellules sont peu ou pas stressées, le contrôle de l'homéostasie rédox des thiols n'est pas très dépendant des glutarédoxines. Il serait principalement effectué par la voie thiorédoxine réductase/thiorédoxines. Cette hypothèse est validée par les faits que la thiorédoxine réductase (Slr0600; mes résultats voir Chapitre III partie V.C) et au moins trois des cinq thiorédoxines (TrxM2 (Slr1057), TrxA2 (Slr1139), TrxA3 (Slr1980); [252]) sont indispensables à la viabilité de *Synechocystis*. Il est même possible [253], mais pas confirmé [252], que TrxA1 (Slr0623) soit également essentielle à survie des cellules.

Par contre, les glutarédoxines sont très impliquées dans la tolérance aux stress. Le mutant  $\Delta grx1$  est sensible au mercure ( $HgCl_2$ ) et à l'uranium ( $((CH_3COO)_2UO_2)$ ). Le mutant  $\Delta grx2$  est sensible au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), au cadmium ( $CdSO_4$ ) et au sélénate ( $Na_2SeO_4$ ). Le mutant  $\Delta grx3$  est sensible au bleu de méthylène. Le triple mutant  $\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3$  est sensible à chacun des toxiques précédemment cités, et aussi, de façon spécifique par rapport aux autres mutants, à un excès (x25) de zinc ( $ZnCl_2$ ). Ces résultats indiquent que les glutarédoxines possèdent une certaine sélectivité, qui implique une régulation de leur abondance et/ou des interactions avec des partenaires spécifiques. C'est pourquoi, j'ai recherché des partenaires protéiques des glutarédoxines, à l'aide d'un système bactérien de "double hybride" [256], basé sur 2 plasmides dans lesquels on peut cloner, indépendamment, les gènes codant pour les protéines "appâts" (chacun des trois gènes *grx*) et les protéines "proies" (les partenaires possibles des glutarédoxines). Pour identifier ces dernières, j'ai participé au clonage d'une cinquantaine des gènes codant pour des enzymes du métabolisme rédox, sans se limiter à celles impliquées dans le contrôle de l'homéostasie rédox des thiols. Parmi les 3000 tests d'interaction possibles, 1000 ont déjà été réalisés (les autres seront

effectués ultérieurement au laboratoire); ils ont permis d'identifier 10 interactions originales impliquant des glutarédoxines. Ensuite, j'ai analysé en détail les interactions: (1) Grx1-réductase du mercure MerA (manuscrit en préparation) et (2) thiorédoxine réductase-Grx1-Grx2 (autre manuscrit en préparation).

J'ai montré que Grx1 contrôle l'état de glutathionylation de MerA qui conditionne son activité de réduction du mercure. Dans un premier temps, j'ai identifié les cystéines (Cys) de Grx1 et de MerA impliquées dans l'interaction Grx1-MerA, à l'aide de mutagenèses dirigées (substitution d'un des résidus cystéines par un résidu sérine) et de tests double hybride. Il s'agit, d'une part de la Cys78 de MerA appartenant à son site rédox actif, et d'autre part de la Cys86 de Grx1 appartenant au site de fixation du glutathion (par inférence des homologies de séquence avec les glutarédoxines d'organismes hétérotrophes [264]). Par contre, aucune des deux Cys du site rédox actif de Grx1, Cys31xxCys34, n'est importante pour l'interaction Grx1-MerA (celle-ci n'est pas perturbée par les mutations simples Cys31Ser ou Cys34Ser). Ensuite, j'ai montré que Grx1 contrôle l'activité de MerA, qui utilise (via son cofacteur FAD) le pouvoir réducteur du NADPH pour réduire le mercure ( $\text{HgCl}_2$ ). Cette activité est aisément dosable *in vitro*; on mesure la consommation du NADPH (de couleur jaune) par la perte d'absorption de la lumière de longueur d'onde égale à 340 nm (le NADP est incolore). J'ai confirmé que l'activité de MerA implique la Cys78 rédox active. Guidés par les travaux de Lillig *et col.* [33] qui ont montré que les glutarédoxines d'*E. coli* régule l'activité de la réductase PAPS, qui catalyse la réduction du sulfate inorganique ( $\text{SO}_4^{2-}$ , +VI) en sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ , +IV), en contrôlant son état de glutathionylation (formation de pont di-sulfure entre des résidus Cys des glutarédoxines et la réductase PAPS) et des molécules de glutathion oxydé (GSSG), nous avons analysé l'influence de Grx1 sur l'activité de MerA. J'ai montré (voir les résultats Chapitre II partie II.C): (i) que la pré-incubation de MerA avec du glutathion oxydé (GSSG) abolit l'activité de MerA et (ii) que celle-ci peut être restaurée par la Grx1 préalablement incubée avec du dithiotreitol (DTT). Ces résultats montrent, d'une part que l'activité de MerA est inhibée par glutathionylation et, d'autre part que Grx1 (réduite) est capable de restaurer l'activité de MerA, vraisemblablement en catalysant sa déglutathionylation. Comme témoins de ces expériences, nous avons vérifié que la Cys86 (site de fixation du glutathion), et les Cys31 et Cys34 (site actif rédox) de Grx1 sont essentielles à son activité de réactivation (déglutathionylation) de MerA glutathionylée. De plus, l'importance de la Cys78 de MerA et de la Cys86 de Grx1 pour les fonctions de ces enzymes a été montré *in vivo* chez *Synechocystis*, en utilisant comme test la tolérance aux métaux lourds Hg ( $\text{HgCl}_2$ ) et U ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{UO}_2$ ). L'hyper sensibilité au Hg et à l'U des

mutants  $\Delta merA$  et  $\Delta grx1$  peut être complétée par des plasmides réplicatifs exprimant, respectivement, les allèles sauvages des gènes *merA* et *grx1*, mais pas les allèles mutants *merA*Cys78 et *grx1*Cys86. Ces résultats suggèrent que le mercure et l'uranium modifieraient l'homéostasie rédox du glutathion, qui altérerait la glutathionylation des protéines. Ces hypothèses seront testées au laboratoire.

Intrigués par l'absence chez *Synechocystis* à la fois de gène homologue à la glutathion réductase, GOR, d'*E.coli*, et d'activité GOR (voir mes résultats Chapitre III), nous avons analysé en détail les interactions: thiorédoxine réductase (TR)-Grx1-Grx2 évoquées plus haut. Une nouvelle fois nous avons combiné la mutagenèse ciblée de divers résidus Cys en Ser avec des tests double hybride d'interaction protéine-protéine. Les Cys impliquées dans l'interaction TR-Grx1 sont la Cys153 de TR et la Cys86 de Grx1 (pas les Cys31 et Cys34 du site rédox actif). Les Cys impliquées dans l'interaction Grx1-Grx2 sont les Cys86 et Cys34 de Grx1 et la Cys36 de Grx2 (la Cys36 n'appartient pas au site rédox actif de Grx2). Ces interactions ont été validées *in vitro*, par des tests spectroscopiques basés sur la consommation du NADPH. Grâce à l'utilisation d'un substrat classique des glutarédoxines le mélange HED (Hydroxy-éthyl-disulfide) + GSH [152], nous avons démontré la voie rédox: TR-Grx1-HED. J'ai aussi vérifié que TR ne peut pas réduire Grx2 de façon directe. Le mélange réactionnel TR-Grx2-HED ne consomme pas de NADPH; il sert ainsi de témoin négatif. En nous basant sur la littérature [263] qui montre que le sélénate peut être réduit par une activité glutarédoxine, nous avons progressé dans la compréhension de la sélectivité des glutarédoxines. En effet, Grx2 est capable de réduire le sélénate (consommation du NADPH par le mélange NADPH + GOR + GSH + Grx2 + Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>), contrairement à Grx1 qui sert ainsi de témoin négatif (pas de consommation du NADPH lorsque Grx1 remplace Grx2). En outre, nous avons confirmé l'interaction TR-Grx1 en montrant que le mélange NADPH + TR + Grx1 + HED consomme du NADPH, contrairement au mélange NADPH + TR + Grx2 + HED (témoin négatif). Enfin, nous avons validé la voie TR-Grx1-Grx2 (consommation du NADPH par le mélange NADPH + TR + Grx1 + Grx2 + Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>). Cette voie rédox possède un vrai sens biologique, car elle explique comment *Synechocystis* est capable de réduire le sélénate, alors qu'elle ne possède pas de gène homologue à celui codant l'enzyme sélénate réductase chez diverses bactéries non photosynthétiques. En outre, l'analyse *in vivo* de Grx1 et Grx2 de *Synechocystis* que j'ai fusionnées à des étiquettes Myc suggère que le sélénate déclenche la production d'un hétérodimère Grx1/Grx2, qui sera analysé en détail au laboratoire (rôle des cystéines et des stress oxydant et métallique).

Plusieurs autres interactions Grx-protéines partenaires identifiées au cours de ce travail

seront analysées en détail au laboratoire, afin de bien comprendre la sélectivité des glutarédoxines. C'est le cas de l'interaction de Grx2 avec la réductase de l'arsenate (ArsC). Ce résultat est intéressant car nous avons montré que ArsC intervient également dans la tolérance au cadmium (voir Article I Houot *et al.*).

Le laboratoire poursuivra également l'analyse des interactions (ex: Grx3-TR) impliquant Grx3, homologue aux Grx de type "monothiol". Grx3 est très intrigante car, à l'instar d'un grand nombre de ses orthologues, elle ne possède pas de Cys dans son site (GlyGlySerAsp) de fixation du GSH.

Enfin, nous avons également identifié, et validé par mutagenèse ciblée, plusieurs interactions entre les glutarédoxines et des ferrédoxines (Fed) bien conservées chez les plantes mais mal connues (aucune publication ne les concerne): il s'agit des interactions Grx2-FedVII, Grx1-FedIII, Grx1-FedII et Grx3-FedVI (résultats non présentés). Ces interactions devraient permettre de mieux comprendre la sélectivité des Fed qui, comme les glutarédoxines, interviennent dans la tolérance aux stress oxydant et métallique (résultats récents du laboratoire).

En conclusion Les "nouvelles" voies rédox caractérisées (Grx1-MerA; TR-Grx1-Grx2-réduction du sélénate) ou identifiées (Grx2-ArsC; Grx2-FedVII; Grx1-FedIII; Grx1-FedII et Grx3-FedVI) au cours de ma thèse sont particulièrement intéressantes. Elles soulignent l'imbrication des activités rédox dépendantes (glutarédoxines) ou supposées indépendantes (ferrédoxines) du glutathion. Nos résultats montrent également qu'il existe des connections étroites entre deux processus rédox, homéostasie rédox des thiols et détoxification des métaux lourds par réduction, qui n'étaient jusqu'ici pas considérés comme étant étroitement imbriqués.





# MATERIEL ET METHODES

## I. Matériels

### A. *Synechocystis* PCC6803

La souche sauvage de *Synechocystis* PCC6803 provient de la collection de l'institut Pasteur (Paris). En condition standard, elle est cultivée à 30°C dans le milieu minéral BG11 [7] supplémenté avec 3,78 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [20], tamponné à pH=7 avec 6 mM d'HEPES (acide N-2 hydroxyéthylepipérazine-N'-éthane-sulfonique).

La composition finale de ce milieu est décrite dans le

Tableau 15 et les éléments traces dans le

Tableau 16.

Composé	Concentration finale (mM)
NaNO <sub>3</sub>	17,65
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,18
MgSO <sub>4</sub>	0,30
CaCl <sub>2</sub>	0,25
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3,78
Di-sodium-magnesium EDTA	0,003
Acide citrique (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0,029
Citrate d'ammonium ferrique (Fe(NH <sub>4</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	0,016

**Tableau 15: Composition du milieu de culture BG11 modifié.** D'après [7].

Composé traces	Concentration finale (µM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,17
CuSO <sub>4</sub>	0,32
MnCl <sub>2</sub>	9,2
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,6
ZnSO <sub>4</sub>	0,77

**Tableau 16 : Composition finale en éléments traces du milieu de culture BG11 modifié.** D'après [7].

Les cultures sont effectuées en milieu liquide, dans un agitateur orbital à rampes lumineuses (Infors Multitron II) ou sur milieu solide, obtenu par ajout de 10 g.l<sup>-1</sup> de Bacto Agar (Difco). La lumière blanche est fournie par des tubes néons (Mazda TF 16 W) et



l'intensité lumineuse standard de culture est fixée à 2500 lux ( $\approx 31,25 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Elle est mesurée à l'aide d'un Luxmètre (Chauvin-Arnoux LUX 710). La concentration cellulaire est déterminée par turbidité à 580 nm (une unité de DO correspondant à  $5 \cdot 10^7$  cellules/ml). La vitesse de croissance de la souche sauvage (temps de doublement du nombre de cellule) est d'environ 10 h à 2500 lux.

Les antibiotiques utilisés pour sélectionner la présence de plasmides d'expression ou de cassettes de délétion sont la kanamycine (Km) (à une concentration de 50 - 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), le chloramphénicol (Cm) (à une concentration de 5 à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), la streptomycine (Sm) et la spectinomycine (Sp) utilisées conjointement (à une concentration de 2,5- 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### B. Souches *E. coli*

La souche d'*E. coli* HB101 ( $F^-$ , hsdS 20 ( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ), *supE44*, *recA13*, *ara14*, *gal K2*, *lacY1*, *proA2*, *rpsL20* ( $\text{Sm}^R$ ), *xyl-5*, *mtl-1*, '*{mcrC-mrr}*') (GIBCO-BRL) a été utilisée pour amplifier les plasmides et les vecteurs permettant de produire les Grxs *in vivo*. *E. coli* HB101 est cultivée à 37°C sur milieu LB (Luria-Bertani, [269]) contenant les antibiotiques adéquats : kanamycine (Km) 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ampicilline (Amp) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , streptomycine (Sm) 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et spectinomycine (Sp) 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

La souche *E. coli* CM404 dérive de la souche HB101 : elle est utilisée pour introduire les plasmides par conjugaison dans *Synechocystis*. Elle correspond à HB101 et contient en plus un plasmide autotransférable (pRK2013 ( $\text{Km}^r$ )) [270]. La réplication du vecteur pRK2013 ( $\text{Km}^r$ ) étant thermosensible, la souche CM404 doit être cultivée à 30°C [23], [25].

La souche *E. coli* DHM1 (*F- cya854 recA1 gyrA69* (NalR) *spoT1*) sert de réceptrice des plasmides utilisés dans le système double-hybride d'*E. coli* [256].

La souche *E. coli* BL21(DE3) (*F- ompT hsdS(rB- mB-)* dcm+ Tetr gal (DE3) endA Hte), fournie par Novagen a été utilisée pour surproduire les protéines de fusion.

## II. Méthodes

### A. Biologie moléculaire

#### 1. Resuspension et dosage des acides nucléiques

Les fragments PCR, plasmides et préparation d'ARN sont resuspendus dans un tampon T0,1E (Tris HCl, 10mM, pH=7,5 ; EDTA, 0,1mM). La quantité d'ADN ou d'ARN est déterminée en mesurant la Densité Optique (DO) à 260nm (1 unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN). Le rapport DO260nm / DO 280nm permet de déterminer la pureté de la préparation ; il doit être égal à 1,8 pour une solution d'ADN.

#### 2. Extraction et purification d'acides nucléiques

##### Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique de *Synechocystis* est extrait à partir d'une culture liquide (500ml) en phase exponentielle de croissance ( $A_{580nm}=0,7$ ), selon la méthode décrite par Labarre et coll. en 1989.

##### Extraction d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Tous les plasmides utilisés dans ce travail ont été purifiés à l'aide du Kit QiaPrep® de QiaGen™. L'ADN est resuspendu dans un tampon T0,1 E (Tris 10 mM- EDTA 0.1 mM) et non dans le tampon d'élution du Kit.

#### 3. Amplification d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La PCR a été utilisée pour :

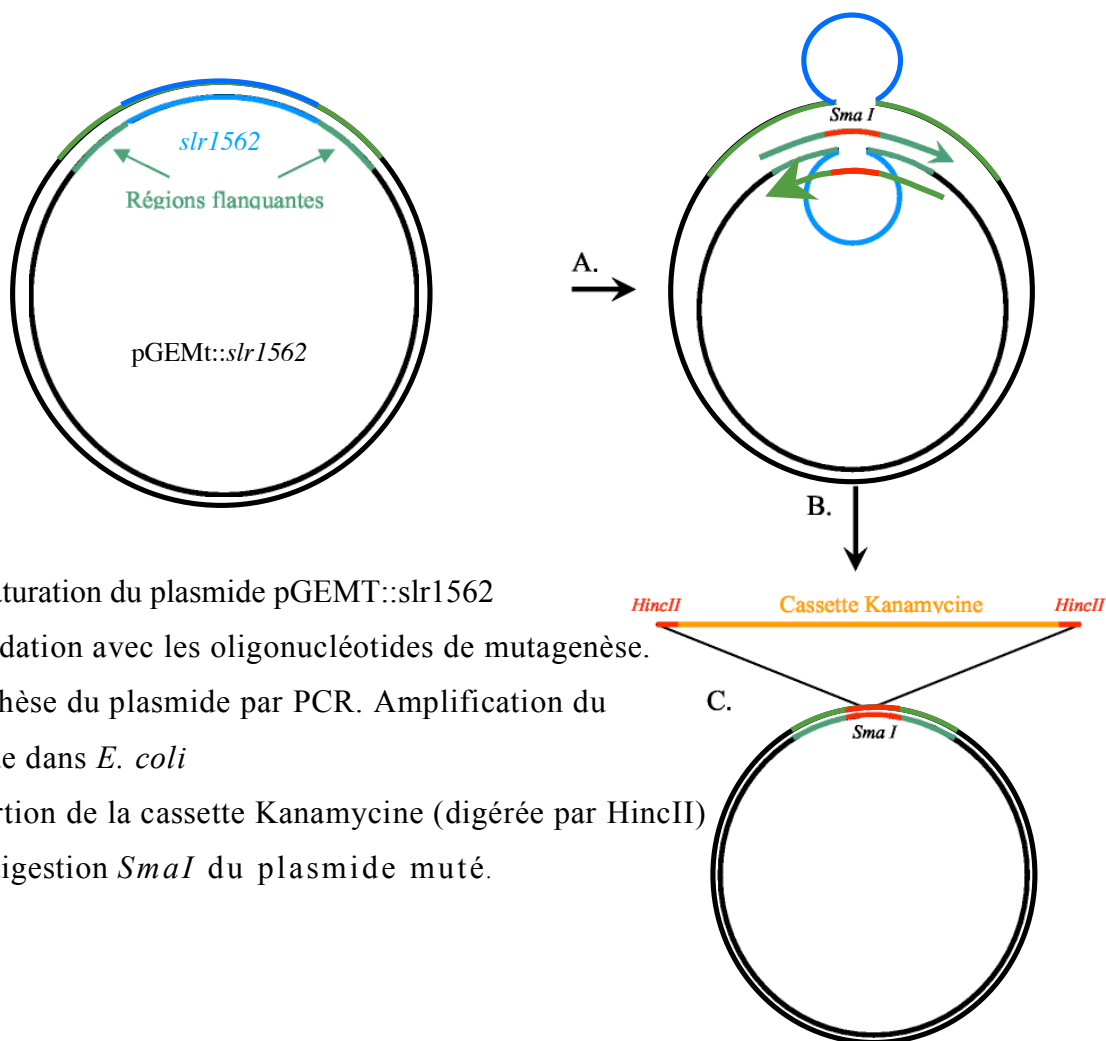
- Amplifier les gènes analysés, à partir de l'ADN génomique de *Synechocystis*,
- Vérifier la conformité des constructions génétiques (orientation, séquences, etc) et l'insertion correcte des cassettes de délétion par recombinaison homologue dans le chromosome de *Synechocystis*. Ces PCR sont réalisées à partir de petites colonies de cellules

entières (PCR sur colonie) resuspendues dans un faible volume d'eau, ce qui permet d'identifier très rapidement les clones souhaités.

Le mélange de réaction suit le protocole fourni par le fabricant de la Taq polymérase Invitrogen<sup>®</sup>. Dans le cas de PCR sur "colonie", une étape préalable est nécessaire pour fragiliser les membranes et libérer l'ADN génomique: 10µl de suspension cellulaire sont chauffés selon le cycle suivant : 5' à 96°C, 1'30 à 50°C, 1'30 à 96°C, 1' à 45°C, 1' 96°C, 1' 40°C.

#### **4. Purification d'un fragment ADN par électrophorèse préparative**

Pour purifier les fragments de 100 pb à 4,5 Kpb les colonnes ultrafree-MC filter unit ont été utilisées suivant la procédure décrite par Millipore. Pour purifier des fragments d'ADN dont la taille dépasse 5Kb le système BioTrap BT1000 (Schleicher & Schuell) est nécessaire. Le fragment d'ADN est séparé sur gel d'agarose 0,6% contenant du Bromure d'Ethidium (200-300nm). La bande d'ADN désirée est découpée sous UV (200-300nm) en limitant la quantité d'agarose récupérée. Ces blocs sont ensuite chargés dans la chambre de chargement délimité par deux membranes BT2, perméables à l'ADN. Un courant continu de 200V est appliqué au dispositif pendant 45 minutes pour transférer l'ADN de la chambre de chargement au compartiment contiguë appelé chambre de récupération. Cette chambre de récupération est délimitée par la membrane BT2 de la chambre de chargement et une membrane BT1, imperméable à l'ADN. A la fin de la migration, le sens du courant est inversé 20 secondes pour décoller l'ADN de la membrane BT1. Le contenu de la chambre est récupéré et précipité avec 2 volumes d'éthanol et 1/10 de volume d'acétate de sodium. Après un lavage à l'éthanol 70%, l'ADN est resuspendu dans 50 µl de T0,1E et quantifié par spectre absorption des UV.



### Séquence nucléotidique de la région génomique de la phase codante du gène *slr1562*:

TTCCAGTTCCAATTTCCAGGTGATGTCATGGCTAATTTGTTCAACTGGCTTCCCTCCTCAGTGGCCGCCAAGCGGA  
 TGGGATCAAAGCCAAAGTGGAAATATATACTTGGCAAACCTTGCCCTTTTTCATCCGGGCGAAACTTTTACTGTGGT  
 GGAAGGGAGTTAAGTTTATCGAGTACAAAATTGACGGCGATGACCAAGCCAGACAGGCCATGGCGGCAAGGGCAGAA  
 GGAAGACGCACTGTGCCCCAAATTTTGTCAATGACCAGGGCATTGGTGGCTGTGACCAACTGTATGGCCTGGACAG  
 CCGCGGCCAGTTAGACCCCTGTTGGCCAATCCTCCTAACCCAGCTAGGTATTATTTGTCCCTGTCC

### Séquence des oligonucléotides de délétion :

*grx1*-Sens : TGGCTAATTTGTTCA~~CCCGGG~~TCCTCCTAACCCAGC  
*grx1*-antiSens: GCTGGGTTAGGAGGA~~CCCGGG~~TGAACAAATTAGCCA  
*SmaI*

**Figure 70: Principe de la mutagenèse de délétion.** Remplacement de la phase codante du gène *slr1562* (codant pour *grx1*) par la cassette de résistance à la kanamycine dans le plasmide pGEM-T.

## 5. Ligation - Transformation par choc thermique chez *E. coli*

Les ligations sont effectuées avec le kit "rapid DNA ligation Kit" de Roche en suivant les indications du fournisseur. 10 µl du mélange de ligation sont ensuite utilisés pour transformer 200 µl d'*E. coli* HB101. Les cellules compétentes sont préparées par traitement au chlorure de Rubidium [271] et transformées par choc thermique : après 30 minutes d'adsorption à 4°C, le mélange "ADN-Cellules compétentes" est placé à 42°C pendant 45 secondes puis à 4°C pendant 2 minutes. Une fois placé à 37°C (ou 30°C pour les souches thermosensibles dérivées de la souche CM404 ou les plasmides à thermorégulation), 800µl de milieu SOC (voir ci-dessous) sont ajoutés. Le mélange est ainsi incubé 1h30 puis étalé sur milieu solide Luria Bertani (LB) contenant les antibiotiques adéquats et placés durant une nuit dans une étuve (30 ou 37°C). SOC (1ml) : Bactotryptone 2g ; Yeast extract 0,5g ; NaCl 10mM ; KCl 2,5mM ; MgCl2 10mM ; MgSO4 10mM ; Glucose 20mM.

## 6. Mutagenèse dirigée

Pour introduire des mutations, créer des sites de restrictions utiles pour nos clonages ou bien pour faire des délétions, nous avons utilisé le principe du kit "quick change mutagenesis" de Stratagène (voir Figure 70). La polymérase ADN pfu (Promega) possède une activité processive permettant de corriger des erreurs de réplication sur une longueur importante (taille d'ADN synthétisé de 3 à plus de 10 Kb). Elle permet donc synthétiser des fragments de grande longueur sans faire de mutations. Les mutations désirées sont créées grâce à deux oligonucléotides complémentaires (voir Figure 70) de taille d'environ 50 nucléotides (20 à 25 nucléotides de part et d'autre de la mutation) comportant au moins 50% de nucléotides G ou C. Le mélange de réaction suit le protocole fourni par le fabricant de la polymérase. Les cycles de PCR suivent le protocole classique mise à part la phase d'élongation. Sa durée dépend de la taille du plasmide matrice : 2 minutes par Kb, allongée de 5 sec à chaque cycle. La mutagenèse dirigée peut aussi être utilisée pour déléter un fragment d'ADN (jusqu'à 1Kb) en une seule étape : les oligonucléotides utilisés s'apparient alors sur 20 à 25 pb de part et d'autre de la zone à déléter (appariement en boucle).

Ce fragment d'ADN sera donc absent du plasmide nouvellement synthétisé. La Figure 70 présente un exemple de mutagenèse de délétion. A la fin de la PCR de mutagenèse l'ADN matrice (méthylé par *E.coli*) est digéré par 10 unités de *DpnI* (Invitrogen) pendant 1 heure à 37°C. 20 µl sont chargés sur un gel d'agarose 0,6% pour vérifier l'amplification du plasmide. Puis 10 µl sont utilisés pour transformer 200 µl de cellules compétentes *E.coli* HB101. Les clones obtenus sont vérifiés par PCR sur colonie puis la région mutée est séquencée.

## 7. Construction des cassettes d'inactivation

Grâce aux techniques et vecteurs précédemment décrits, j'ai construit les cassettes d'inactivation des gènes codant pour les glutarédoxines : *grx1* (*slr1562*), *grx2* (*ssr2061*), *grx3* (*slr1846*) ; pour la thiorédoxine réductase *tr* (*slr0600*), pour la réductase du mercure *merA* (*slr1849*) et la réductase de l'arsenate *arsC* (*slr0946*) (Tableau 17).

Plasmide	Description
<b>Plasmides utilisés</b>	
pGEMt	Vecteur de clonage AT AmpR (Promega)
pUC4K	Source du marqueur Km <sup>R</sup> (Pharmacia)
pFC1	Source des marqueurs Sm <sup>R</sup> (Prentki P, 1991) et Cm <sup>R</sup> (Mermet-Bouvier, 1994)
<b>Plasmides hébergeant les gènes codant pour les glutarédoxines, TR, MerA et ArsC</b>	
pGrx1	pGEMt avec le gène <i>grx1</i> flanqué par 300 pb en amont du codon «Start» et 300 pb en aval du codon stop
pGrx2	pGEMt avec le gène <i>grx2</i> flanqué par 267 pb en amont du codon «Start» et 307 pb en aval du codon stop (construit par F. Domain)
pGrx3	pGEMt avec le gène <i>grx3</i> flanqué par 300 pb en amont du codon «Start» et 300 pb en aval du codon stop
pTR	pGEMt avec le gène <i>tr</i> flanqué par 300 pb en amont du codon «Start» et 257 pb en aval du codon stop
pMerA	pGEMt avec la partie N-terminale du gène <i>merA</i> (1-357 pb) flanqué par 126 pb en amont du codon «Start»
pArsC	pGEMt avec le gène <i>arsC</i> flanqué par 300 pb en amont du codon «Start» et 300 pb en aval du codon stop
<b>Construction des cassettes d'inactivation</b>	
pGrx1	pGrx1 avec le marqueur Km <sup>R</sup> inséré entre les nucléotides 5 et 104 de <i>grx1</i>
pGrx2	pGrx2 avec le marqueur Sm <sup>R</sup> inséré en sens inverse à la place de <i>grx2</i>
pGrx3	pGrx3 avec le marqueur Cm <sup>R</sup> inséré entre les nucléotides 2 et 99 de <i>grx3</i>
pTR	pTR avec le marqueur Cm <sup>R</sup> inséré entre les codons 9 et 317 de <i>tr</i>
pMerA	pMerA avec le marqueur Km <sup>R</sup> inséré au niveau du nucléotide 84 de <i>merA</i> (insertion d'un site SmaI)
pArsC	pArsC avec le marqueur Km <sup>R</sup> inséré entre les nucléotides 7 et 230 d' <i>arsC</i>

**Tableau 17 : Caractéristiques des plasmides utilisés pour les inactivations.** Cassettes d'inactivation des gènes codant pour les glutarédoxines, la thiorédoxine réductase, la réductase du mercure et la réductase de l'arsenate

## 8. Construction des fusions myc-Grx1 et Grx2-myc

Les fusions myc-Grx1 et myc-Grx2 ont été réalisées par PCR successives. Une première PCR a permis d'amplifier les régions du chromosome de *Synechocystis* contenant les gènes *grx1* et de *grx2*.

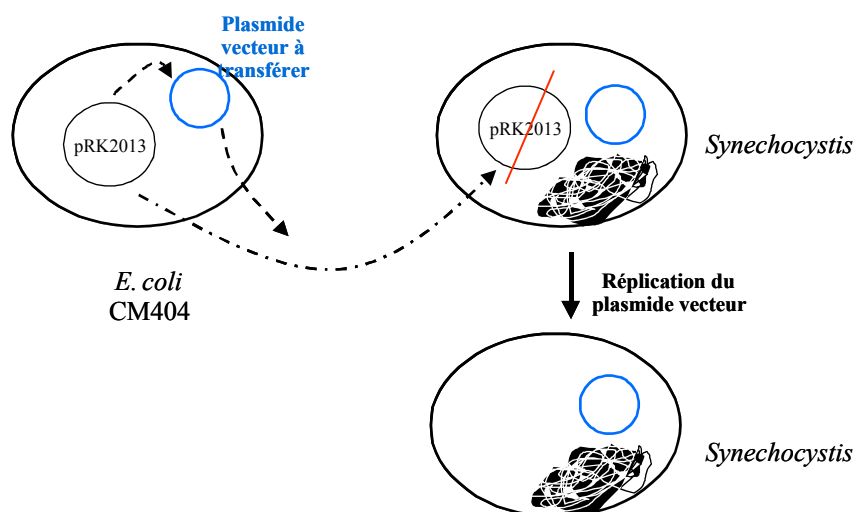
L'insertion de l'étiquette myc est réalisée par PCR en utilisant des oligos contenant la séquence GAACAAAAGTTGATTTCTGAAGAAGATTTGTAA codant l'épitope myc qui est le décapeptide EQKLISEEDLL. Les protéines fusionnées correspondantes sont clonées dans le vecteur pSB2A introduit dans *Synechocystis* par conjugaison.

## 9. Réactions de séquence

Les réactions de séquence ont été réalisées en suivant le protocole de séquence par fluorescence avec terminateur Big-Dye (Perkin Elmer®). Les amorces utilisées varient en fonction du plasmide à séquencer. Elles sont situées à environ 50 pb du fragment d'intérêt. Les séquences ont été vérifiées sur les deux brins puis analysées à l'aide du programme Sequencher V4.1 de Gene Codes Corporation®.

### B. Conjugaison de plasmide chez *Synechocystis*

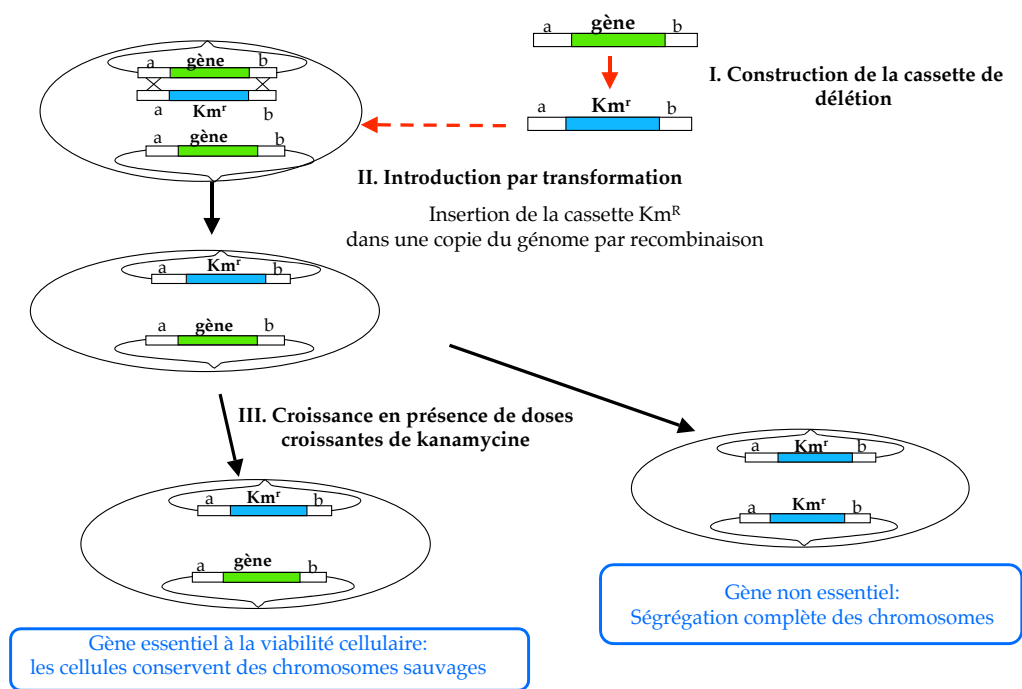
La conjugaison est réalisée selon le protocole décrit par [25] (Figure 71). Le plasmide autotransférable pRK2013 contenu dans la souche d'*E. coli* CM404 entraîne avec lui (mobilise) le plasmide vecteur portant les gènes à analyser chez *Synechocystis*. Ce vecteur dérive du plasmide à large spectre d'hôte RSF1010. Chez *Synechocystis* il se réplique à raison de 10 copies par cellule (soit 1 copie par copie du chromosome polyploïde). Par contre, le plasmide pRK2013 ne se réplique pas chez *Synechocystis*. Ce système permet l'analyse des promoteurs [23] et des protéines [25].



**Figure 71 : Principe de la conjugaison chez *Synechocystis*.** Seul un chromosome de *Synechocystis* est représenté.

Le plasmide à conjuguer est introduit dans la souche *E. coli* CM404 et cultivée en milieu LB (complété des antibiotiques adéquat), à 30°C durant une nuit (phase stationnaire) :  $3 \cdot 10^8$  cellules de cette culture sont mélangés à une quantité équivalente de cyanobactéries en phase exponentielle de croissance. Le mélange de cellule est incubé 20 à 24h à 30°C dans 9,5 ml de BG11 + 0,5 ml de LB, à 3500 lux en agitation très douce puis étalé sur 5 boîtes (100µl par boîte) de milieu solide BG11 (1% d'Agar) complémenté des antibiotiques adéquats (Sm et Sp et/ou Cm). Les conjugants apparaissent après 5 à 9 jours.





**Figure 72: Etapes de transformation et d'inactivation de gène chez *Synechocystis* PCC6803.** Exemple d'inactivation de gène essentiel et non essentiel. *Synechocystis* possède 10 copies de chromosome [20], le schéma n'en présente que 2 copies

### C. Transformation et inactivation de gène chez *Synechocystis*

La transformation naturelle de *Synechocystis* est utilisée pour inactiver ou modifier un gène présent sur le chromosome. La cassette de délétion porte les régions flanquantes (d'environ 300 pb) du gène à remplacer entourant le gène marqueur codant pour l'antibiotique de résistance (cassette de résistance) pour pouvoir sélectionner l'arrivée de la cassette dans le chromosome [20].

La souche est transformée selon la méthode décrite par Labarre *et col.*. Les cellules sont maintenues en phase exponentielle à 3500 lux (ne dépassant pas une  $DO_{580}$  de 0,5). Au troisième repiquage, 40ml de culture sont centrifugés (10 mn à 10000g) et lavés avec 10ml de milieu BG11. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 5 ml de milieu BG11. 1 $\mu$ g d'ADN dilués dans 100  $\mu$ l de T0,1E pH 7,5 sont mélangés avec 1 ml de suspension cellulaire et exposés à 3500 lux à 30°C, sans agitation, pendant 1h30. Le mélange de transformation est étalé sur 10 boîtes (100  $\mu$ l par boîte) de milieu solide BG11 (1% d'Agar). 0,4 ml d'antibiotique de sélection (kanamycine à 4mg/ml par boîte ou chloramphénicol à 0,1 mg/ml par boîte ou spectinomycine à 0,05 mg/ml) est ajouté sous l'agar au bout de 20h d'exposition (3000-3500 lux à 30°C). Les transformants apparaissent dans les mêmes conditions de culture après 5 à 9 jours d'incubation. *Synechocystis* porte environ dix copies du chromosome. A cette étape, les clones résistants à l'antibiotique sélectif sont encore hétéropléïdes pour le gène délété : ils portent à la fois des copies mutantes de chromosome véhiculant la délétion et des copies sauvages portant toujours l'allèle sauvage du gène analysé.

Ces transformants sont donc repiqués en augmentant la concentration de l'antibiotique sélectif et donc la pression de sélection. (concentrations croissantes de : kanamycine de 50 à 300  $\mu$ g/ml ou chloramphénicol de 20 à 50  $\mu$ g/ml ou spectinomycine de 2,5 à 5  $\mu$ g/ml). Ceci avantage la propagation des copies mutées (porteuses de la délétion) au détriment des copies sauvages portant le gène intact. Dans le cas d'un gène essentiel à la viabilité cellulaire, la souche mutante restera « hétéropléïde » conservant des copies sauvages du gène. Par contre, lorsque le gène n'est pas critique, la ségrégation des chromosomes est complète, le mutant ne possède plus aucune copie sauvage de chromosome. La présence de copies sauvage et l'insertion de la cassette de résistance ( $Km^R$ ,  $Cm^R$  ou  $Sp^R$ ) sont vérifiées par PCR sur colonie.

La Figure 72 résume ces étapes d'inactivation.

## D. Double-hybride *E.coli*

### 1. Test double-hybride

Le double-hybride permet de mettre en évidence une interaction entre deux protéines. Divers systèmes double hybride sont disponibles [272]. Nous avons travaillé avec le système développé par Karimova et coll. (1998) et distribué par Hybrigenics®, qui utilise la souche *E.coli* DHM1, déficiente pour l'adénylate cyclase (Cya<sup>-</sup>). Elle possède un gène rapporteur *LacZ* (codant pour la  $\beta$ -Galactosidase), induit par l'AMPc. Les phases codantes sont clonées dans les deux vecteurs, pUT18 (Amp<sup>R</sup>) et pKT25 (Km<sup>R</sup>) qui portent chacun un domaine différent (T18 et T25) du gène codant pour l'enzyme adénylate cyclase de *Bordetella pertusis*. Si les deux protéines analysées sont capables d'interagir entre elles, alors le rapprochement des deux sous-unités (T18 et T25) de l'adenylate cyclase restaure son activité. Celle-ci déclenche la production de l'AMP cyclique (AMPc) permettant l'activation du gène *lacZ*. Une coloration bleue des clones est alors obtenus sur milieu LB + X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, 40 $\mu$ g/ml) + IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside 1mM, active l'expression des vecteurs pUT18, pKT25 et dérivés). Les vecteurs pUT18 et pKT25, n'exprimant que les fragments T18 et T25 servent de témoin négatif. Les vecteurs pKT25-Zip et pUT18-Zip sont utilisés comme témoins positifs d'interaction. Ils dérivent des vecteurs pUT18 et pKT25 et expriment les domaines T18 et T25 fusionnés à un motif Leucine Zipper (protéine GCN4 de la levure).

Le système est décrit dans la Figure 73 ci-dessous.

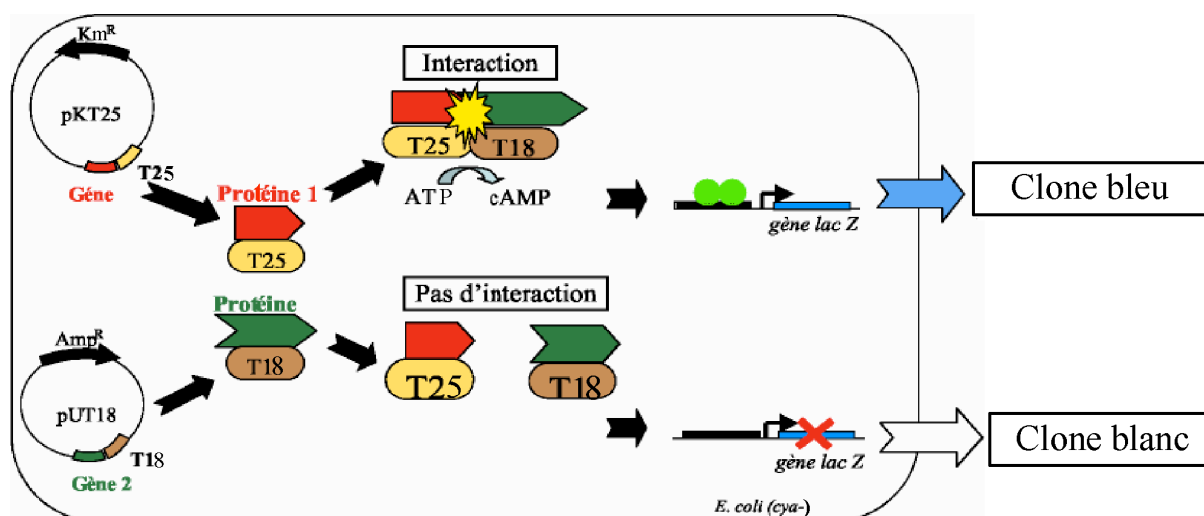


Figure 73: Principe de fonctionnement du système double hybride bactérien.

## 2. Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase

Pour quantifier l'intensité des interactions obtenues lors du test double-hybride, les clones positifs et négatifs sont soumis à un dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase.

10 ml de culture du clone testé sontensemencés à partir d'1 ml d'une culture en phase stationnaire (milieu LB + Km 50  $\mu$ g/ml, Amp 50  $\mu$ g/ml et Acide Nalidixique (Nal) 20  $\mu$ g/ml, IPTG 1mM) et incubés pendant 3h à 30°C. La DO final à 600 nm doit être comprise entre 0,5 et 1 unités. Les cellules sont lavées à 4°C avec du Tris HCl 50 mM pH=8 puis resuspendues dans 2ml du même tampon. Elles sont ensuite congelées dans des presses de Eaton préalablement refroidies dans un mélange éthanol/carboglace (-80°C), puis cassées à 250 Mpa. Le lysat est centrifugé 45 minutes à 16000 g et à 4°C. Le surnageant est aliquoté et conservé à -20°C.

La mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre DU640B de Beckman. 25, 50 et 100  $\mu$ l du surnageant sont dilués dans 1 ml d'un mélange de tampon Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM pH 7,5 ; MgSO<sub>4</sub> 1 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 50 mM) et d'ONPG (o-Nitrophenyl-  $\beta$ -D-Galactopyranoside) (0,5mg/ml final). La quantité d'ONPG hydrolysé est déterminée en mesurant l'augmentation de DO<sub>420</sub> en fonction du temps.

L'Activité Spécifique (AS) est exprimée en nmol d'ONPG.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine (Figure 74).

Afin d'obtenir des données statistiques, nous avons effectué trois mesures pour chaque clone analysé. Nous avons répété cette opération sur deux autres clones frères issus de deux transformations distinctes.

$$\text{Activité spécifique: } AS = \frac{\Delta P \cdot 10^6 \cdot V_{\text{total}}}{4,5 \cdot V_e \cdot [X]} \quad (\text{en nmol d'ONPG.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ de protéines})$$

$\Delta P$  = Différence entre la pente des graphiques avec et sans ONPG.

$[X]$  = Concentration en Protéines (mg.l<sup>-1</sup>) dans l'extrait brut.

$V_{\text{Total}}$  =  $V_r + V_e + V_{\text{ONPG}}$  (en ml).

$V_r$  = Volume de réactif (tampon Z) seul (0,8 ml).

$V_e$  = Volume d'échantillon brut (5 à 200  $\mu$ l).

$V_{\text{ONPG}}$  = Volume d'ONPG dans le tampon Z (200 $\mu$ l).

**Figure 74: Calcul de l'activité spécifique de la  $\beta$ -galactosidase**

Les clones servant de témoin négatif portent les plasmides sans insert et des couples de protéines ne présentant pas d'interaction (de couleur blanche sur les boîtes de transformation), ont généralement une activité proche de 100 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. Le témoin positif (test d'interaction des domaines Zip-Zip) possède une activité spécifique autour de 4000 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (Tableau 18).

	pKT25	pUT18	Activité spécifique $\beta$ -Gal (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
Témoin positif	Zip	Zip	4213 $\pm$ 215
Témoin négatif	Vide	Vide	75 $\pm$ 4

**Tableau 18: Activité  $\beta$ -galactosidase des témoins positif et négatif**

### 3. Dosage de protéines

Les dosages ont été réalisés par la technique de Bradford selon les indications du fournisseur (BIORAD, [273]). La gamme étalon (10 valeurs) est obtenue en diluant progressivement la solution standard SAB (Sérum Albumine Bovine) de 1 à 10  $\mu\text{g/ml}$  (concentration finale). Trois mesures par échantillon sont effectuées pour obtenir une mesure fiable de la quantité de protéines.

#### E. Méthodes d'analyse biochimiques

##### 1. Surproduction de protéines de fusion

Les protéines à purifier sont fusionnées en N-terminal ou en C-terminal à une étiquette (Tag) dotée d'une grande affinité d'interaction. Ceci permet la purification par chromatographie d'affinité des protéines taggées.

Deux types de Tags ont été utilisés dans cette étude : le Tag Histidine (His), qui consiste en une queue 6xHis et le Tag GST (pour Glutathion S-Transferase). La fusion His est utilisée pour la purification de protéines en vue de tests *in vitro*. La faible taille de ce Tag (<0,5kDa) permet dans la plupart des cas de conserver la fonction et l'activité enzymatique de la protéine analysée. La fusion GST est plus grande (12kDa) et n'est utilisée dans cette étude que pour immobiliser les protéines et confirmer certaines interactions observées en double hybride.

Le Tag histidine se lie à des billes possédant des atomes de nickel à leur surface (Ni-NTA agarose beads, Invitrogen). Le Tag GST a la propriété de se lier à des billes glutathionylées (-SG) (Glutathione sepharose 4B beads, Amersham Biosciences).

J'ai réalisé des fusions histidine en N-terminal dans les plasmides de fusion pTRc (Invitrogen) (TR, Grx2 et MerA) et pQE31 (Qiagen) (Grx1) et en C-terminal dans le plasmide pET21 (Novagen) (Grx1). J'ai réalisé une fusion GST en C-terminal (Grx1) à l'aide du plasmide pETM30 (dérivé des plasmides pET, Novagen).

## 2. Purification des protéines de fusion (-His)

J'ai adapté le protocole proposé par Alexander Silberman, de l'Institut of Life Sciences (Hebrew University of Jerusalem). Je l'ai appliqué pour la purification des protéines de fusion suivantes : His-Grx1, Grx2-His, TR-His et MerA-His.

Une préculture de 10 mL de culture en phase stationnaire d'*E. coli* BL21 DE3 contenant les divers plasmides de surproduction est utilisée pour inoculer un erlen de 200 mL de milieu Lb contenant les antibiotiques sélectifs appropriés. La culture est incubée sous agitation à 30°C pendant 2-3 heures, jusqu'à obtenir une DO=0,5 (fin de phase exponentielle). Les surproductions sont induites avec de l'IPTG ((Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1 mM) pendant 4 heures. Les cellules sont centrifugées (10 min, 14000 g, 4°C), le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans un tampon PBS 1X froid (NaCl 150 mM, Phosphate disodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM et NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM), pH 7,4 10 mM). Après une nouvelle centrifugation (10 min, 14000 g, 4°C), les culots sont repris dans 2 mL d'un tampon de lyse (50mM TrisHcl pH 7,5, 0,3 M NaCl, 5 mM β-Mercaptoethanol (SIGMA) et 0,1% Triton (SIGMA)). Ces extraits cellulaires sont cassés à 250 Mpa à l'aide d'une presse de Eaton (-80°C). Les broyats sont centrifugés (20 min, 14000 g, 4°C). Les protéine solubles contenues dans le surnageant sont ainsi séparées des débris cellulaires (membranes et éléments du milieu insolubles). La qualité de surproduction de la protéine taggée est évaluée en faisant migrer un aliquot sur un gel SDS-Page (10 à 15% en fonction de la taille de la protéine taggée) et en révélant les protéines par coloration au bleu de Comassie.

Le reste du surnageant protéique obtenu est incubé 1h à 4°C, sous agitation douce, avec 50 µL de billes de Ni-NTA Agarose (QIAGEN) préalablement équilibrées (2 lavages avec 3 mL H<sub>2</sub>O puis 2 lavages avec 3 mL du tampon de lyse (voir ci-dessus). Le mélange est centrifugé (3 min, 3500 rpm, 4°C) et le surnageant est éliminé. Les billes sont reprises 2 fois dans 3 mL d'un tampon de lavage (50 mM TrisHCl pH 7,5, 0,3 M NaCl, 30 mM Imidazole). La protéine Taggée est ensuite éluée dans 100 µL d'un tampon de lavage auquel a été ajouté 250 mM d'Imidazole. Les aliquots de protéines purifiées sont conservés à -20°C et sont décongelés sur la glace à chaque utilisation. L'estimation de la qualité de la purification (en %) de la protéine taggée est évaluée sur un gel SDS-Page (10 à 15% en fonction de la taille de la protéine taggée) coloré en Bleu de Comassie.

### 3. Réduction et Glutathionylation *in vitro* des protéines purifiées

La réduction d'une protéine purifiée a été réalisée d'après [33]. La protéine purifiée est incubée pendant 15 min à 22°C dans un tampon Tris/HCl 50 mM, pH = 8 en présence de 10 mM de DTT (réduction des ponts disulfures). La protéine ainsi réduite est purifiée sur des colonnes d'ultrafiltration (Amicon YM3, Millipore).

L'étape de glutathionylation est réalisée sur une protéine précédemment réduite. 200  $\mu$ M de la protéine réduite sont incubés avec 20 mM de glutathion oxydé (GSSG) pendant 30 min à 22°C dans un tampon Tris/HCl 50 mM, pH = 8. La protéine ainsi glutathionylée est purifiée sur des colonnes d'ultrafiltration (Amicon YM3, Millipore).

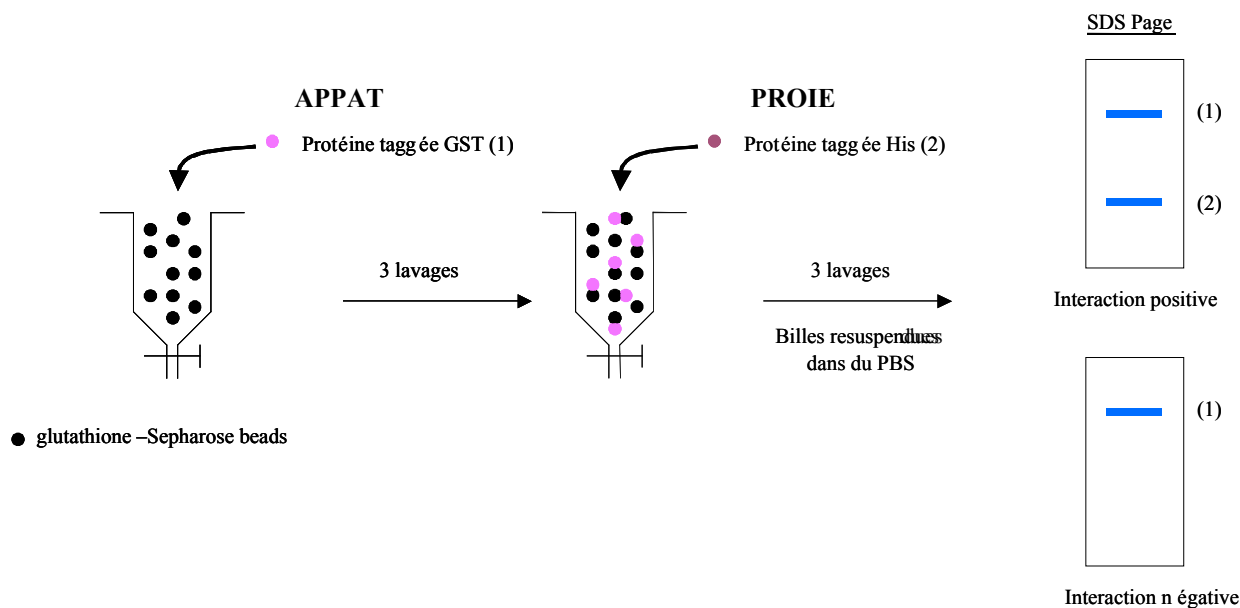
### 4. La technique du GST Pulldown

#### a) Principe

Cette technique est très largement utilisée dans la littérature pour confirmer des interactions observées grâce à la technique du double-hybride (Figure 75). Ce test biochimique permet d'analyser l'interaction entre deux protéines fusionnées à des étiquettes distincts (P1-GST et P2-His).

La protéine fusionnée à l'étiquette GST (P1-GST) présente dans le premier extrait brut peut se fixer sur des billes glutathionylées (la GST se lie aux résidus de glutathion). Puis, après lavage, l'extrait contenant la deuxième protéine (P2-His, fusionnée à l'étiquette histidine) est incubée avec le mélange précédent. Si les deux protéines interagissent, alors la seconde protéine (P1-His) sera retenue par la première (P2-GST) préalablement fixée sur les billes, si non, elle sera éluée lors des différents lavages. Le témoin de ce test consiste en la fixation de la GST libre sur les billes et en la vérification de la non-fixation de la protéine fusionnée à l'histidine (P1-His). L'interaction entre les deux protéines est visualisée un gel SDS-Page, coloré au bleu de Coomassie (Figure 75).





**Figure 75 : Principe du GST Pulldown**

### **b) Protocole**

Une préculture de 10 mL de cellules *E. coli* BL21 DE3 contenant le plasmide surproduisant la fusion Grx1-GST (ici PETM30-Grx1) est utilisée pour inoculer un erlen de 100 mL de milieu LB. La culture est incubée sous agitation à 30°C pendant 2-3 heures, jusqu'à obtenir une DO=0,5 (fin de phase exponentielle). Les cellules sont alors induites à l'IPTG ((Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) pendant 4 heures, avant d'être collectées par centrifugation (10 min, 14000 g, 4°C). Le culot est resuspendu et lavé avec 2mL de tampon de lyse (PBS 1X, 1mM PMSF, 10 mM DTT et 0,1% Triton). Après une nouvelle centrifugation (10 min, 5000 rpm, 4°C), les culots sont repris dans 1 mL de ce même tampon de lyse. Après cassage et centrifugation (voir plus haut), le surnageant contenant les protéines solubles est aliquoté et conservé à -20°C.

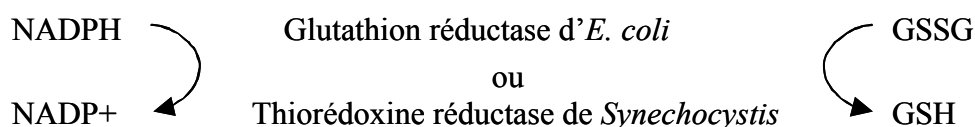
Un aliquot de 1mL est incubé 1 heure à 4°C, sous agitation douce, en présence de 50 µL de billes glutathionylées (Glutathione sepharose beads, Amersham Biosciences). Les billes sont collectées par centrifugation (1000 g, 3min, 4°C) puis lavées deux fois (tampon de lavage (PBS 1X, 1M NaCl, 10 mM DTT)) et deux fois à l'aide d'un second tampon (PBS 1X, 10 mM DTT). Elles sont ensuite incubées avec un aliquot de 1 mL de l'extrait cellulaire contenant la surproduction de la protéine de fusion MerA-His (obtenu comme décrit précédemment, 2II.E.2) est ensuite incubé 1 heure à 4°C, sous agitation douce. Le témoin

négatif consiste à incuber la fusion MerA-His avec des billes d'agarose glutathionylées liées à la GST libre.

## 5. Dosage d'activités enzymatiques *in vitro*

### a) Dosage de l'activité glutathion réductase

La glutathion réductase utilise le pouvoir réducteur du NADPH, via son co-facteur FAD, pour réduire le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) [262]. Ce dosage peut être réalisé sur d'autres protéines que la glutathion réductase (ex : la thiorédoxine réductase) (Figure 76).



**Figure 76 : Principe du dosage de l'activité glutathion réductase.** D'après [262].

L'activité est dosée en mesurant la baisse de l'absorbance à 340 nm correspondant à la longueur d'onde d'absorbance du NADPH. La réaction est suivie pendant dix minutes, dans 100  $\mu$ L d'un mélange réactionnel contenant 0,2 M de tampon phosphate pH 7.4 ; 0,2 mM NADPH ; 1 mM EDTA ; 0,1 mg/mL BSA et 2  $\mu$ M FAD. 1 mM GSSG sont ajoutés après 10 min d'incubation, la mesure d'absorbance est réalisée avec un spectrophotomètre Beckman DU640 [262]. L'activité est mesurée en  $\mu$ mol de NADPH.  $\text{min}^{-1}$ . mg de protéine $^{-1}$ .

## b) Dosage de l'activité de la réductase du mercure

Tout comme la glutathion réductase, la réductase du mercure a le pouvoir d'utiliser le pouvoir réducteur du NADPH (via son co-facteur FAD) (Figure 77) [238].

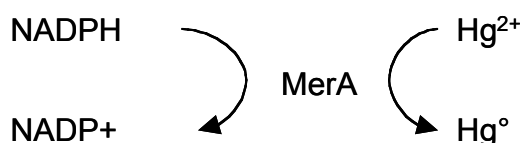


Figure 77 : Principe du dosage de l'activité réductase du mercure. D'après [238].

Le dosage de son activité enzymatique est réalisé en mesurant la décroissance de l'absorbance à 340 nm correspondant à la longueur d'onde d'absorbance du NADPH. La réaction est suivie à 37°C dans 100  $\mu$ L d'un mélange réactionnel contenant un tampon contenant 80 mM de tampon phosphate de sodium, pH 7.4 ; 0,2 mM NADPH ; 1 mM 2-mercaptoethanol ; 1 mM EDTA ; 0,1 mg/mL BSA et 2  $\mu$ M FAD [238]. 100  $\mu$ M de HgCl<sub>2</sub> sont ajoutés après 10 min d'incubation, la mesure d'absorbance est réalisée avec un spectrophotomètre Beckman DU640. L'activité est mesurée en  $\mu$ mol de NADPH. min<sup>-1</sup>. mg de protéine<sup>-1</sup>.

## c) Dosage de l'activité glutarédoxine

Le dosage de l'activité des glutarédoxines est réalisé en présence d'un réducteur utilisant le NADPH et d'un substrat spécifique (Figure 78) [264].

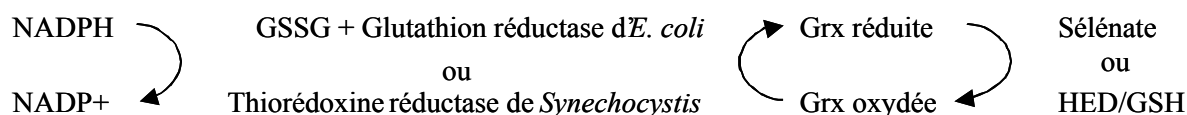


Figure 78 : Principe du dosage de l'activité glutarédoxine. D'après [264].

Les substrats connus des glutarédoxines sont le sélénate [263] et le mélange Hydroxyéthylthiolsulfide (HED + glutathion réduit (GSH) formant un pont disulfure. Dès lors,

le dosage de l'activité enzymatique des glutarédoxines est réalisé en mesurant la décroissance de l'absorbance à 340 nm correspondant à la longueur d'onde d'absorbance du NADPH. Le mélange réactionnel est composé d'un tampon TrisHCl (50 mM, pH8) et contient du NADPH (0,2 mM), de l'EDTA (2 mM), de la BSA (0,1 mg/mL), du glutathion oxydé (GSSG) (1mM) + la glutathion réductase d'*E. coli* (SIGMA) (0,5  $\mu$ M) ou la thiorédoxine réductase de *Synechocystis* purifiée (TR-His) (0,5  $\mu$ M), du sélénate (5 mM) ou un mélange HED (0,7 mM) + GSH (1 mM). L'activité est mesurée en  $\mu$ mol de NADPH. min<sup>-1</sup>. mg de protéine<sup>-1</sup>.

## F. Analyse *in vivo*

### 1. Test de tolérance aux métaux lourds et aux agents oxydants

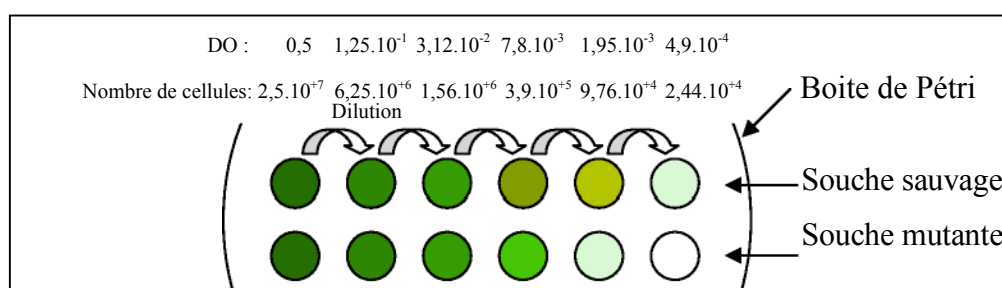
Pour montrer ou confirmer qu'un gène intervient dans la tolérance à un agent toxique, on teste en parallèle l'influence de cet agent sur la croissance de la souche sauvage et des mutants (inactivation ou mutations ponctuelles) du gène analysé (Tableau 19).

Agents toxiques	Concentration sur boîte
<b>AGENTS OXYDANT</b>	
Peroxyde d'hydrogène	32 $\mu$ M, 34 $\mu$ M, 36 $\mu$ M
Bleu de méthylène	600 nM, 700nM, 800 nM
ter-butylperoxyde	50 nM, 70 nM, 700 nM
Paraquat	30 $\mu$ M, 50 $\mu$ M
Ménadione	100 nM, 1 $\mu$ M
Diamide	10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M
<b>METAUX</b>	
Sulfate de cadmium (CdSO <sub>4</sub> )	3 $\mu$ M, 3,5 $\mu$ M, 4.5 $\mu$ M
Sélénate de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> )	10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M
Sélénite de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	300 $\mu$ M, 400 $\mu$ M, 500 $\mu$ M
Chlorure de mercure (HgCl <sub>2</sub> )	2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M
Acétate d'uranyle ((CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> UO <sub>2</sub> )	700 $\mu$ M, 800 $\mu$ M
Arsénite (Na <sub>2</sub> AsO <sub>3</sub> )	200 $\mu$ M, 400 $\mu$ M
Chlorure de zinc (ZnCl <sub>2</sub> )	19 $\mu$ M, 25 $\mu$ M

**Tableau 19: Doses d'agents toxiques utilisées pour les tests de tolérance aux stress oxydants et métalliques.**

## a) Sur milieu solide

Les souches analysées sont cultivées dans les conditions standard jusqu'à une  $DO_{580}$  de 0,5. Les suspensions sont diluées 6 fois de suite d'un facteur 4 dans le milieu BG11 (Figure 79). Les cellules sont alors déposées en gouttes de 10  $\mu$ l sur des boîtes de milieu BG11 solidifiées par de l'Agar 1% (DIFCO) et contenant ou non des concentrations variées d'un toxique (concentrations finales indiquées dans le Tableau 19).



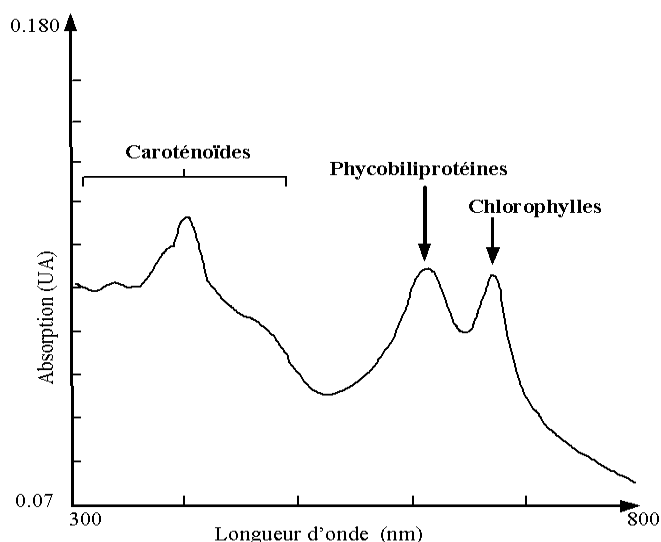
**Figure 79: Influence d'un gène sur la croissance ou la viabilité de *Synechocystis* incubée sur un milieu solide contenant ou non un agent toxique**

Au bout de 4 jours d'incubation à 30°C à 2500 lux, les boîtes sont visualisées. La tolérance des diverses souches est estimée en comparant le nombre de « gouttes » qui apparaissent : dans l'exemple ci-dessus, la souche mutante est plus sensible que la souche sauvage au toxique contenu dans la boîte de Pétri.

## 2. Analyse globale des pigments de *Synechocystis*

Une culture en milieu de phase exponentielle est diluée jusqu'à obtenir une  $DO_{800} = 0,1$ . Un spectre est réalisé entre 350 et 800 nm sur 50 à 100  $\mu$ l de culture (Spectrophotomètre DU640B de Beckman). Trois familles de pigments sont identifiables : Caroténoïdes, phycobiliprotéines (phycocyanine) et Chlorophylles (Figure 80).

Cette technique est appliquée à différents mutants dans des conditions standard ou à une souche soumise à différents traitements.



**Figure 80 : Absorbance des différents pigments de *Synechocystis*.** Les caroténoïdes représentent une vaste famille de composés qui absorbent jusqu'à 500-550 nm. Les longueurs maximales d'absorbance des phycobiliprotéines est à 620 nm celles des chlorophylles est entre 680 (PSI) et 700 nm (PSII) (indiquées par des flèches sur la figure).

### 3. Etude de l'état rédox des glutarédoxines *in vivo*

#### a) Extraction TCA

Cette technique permet de figer l'état rédox des cystéines (le TCA bloque la réactivité des groupements thiols) et donc de visualiser l'existence de ponts disulfures [274]. Je l'ai appliqué à l'analyse des protéines de fusion myc-Grx1 et de myc-Grx2. La détection de la présence et de l'abondance de ces protéines fusionnées *in vivo* est réalisée par Western Blot.

A partir d'une pré-culture de 50 mL en milieu sélectif, une culture de 200 mL ( $DO_{580} = 0,1$ ) est incubée à 30°C jusqu'à ce qu'à une  $DO_{580}$  atteigne 0.4-0.5. Les cellules mutantes et la souche sauvage sont exposées à différents agents aux doses et aux temps indiqués. 200 ml de culture sont utilisés pour chacune des doses testées. L'exposition est arrêtée par ajout dans le milieu d'acide trichloroacétique (TCA)(20% final) (4°C) et les cellules sont centrifugées (14000 g, 1 min, 4°C). Le culot est ensuite lavé dans 2 mL de TCA 20% puis les échantillons sont transférés dans un tube de microcentrifugation. Le culot est ensuite congelé dans un bain carboglace/éthanol (EtOH) puis éventuellement conservé à -80°C. Les cellules sont broyées à 250 Mpa à l'aide d'une presse de Eaton (comme décrit précédemment). Les extraits sont ensuite décongelés sur la glace et centrifugés 20 minutes à 14000 g, à 4°C. Le culot,

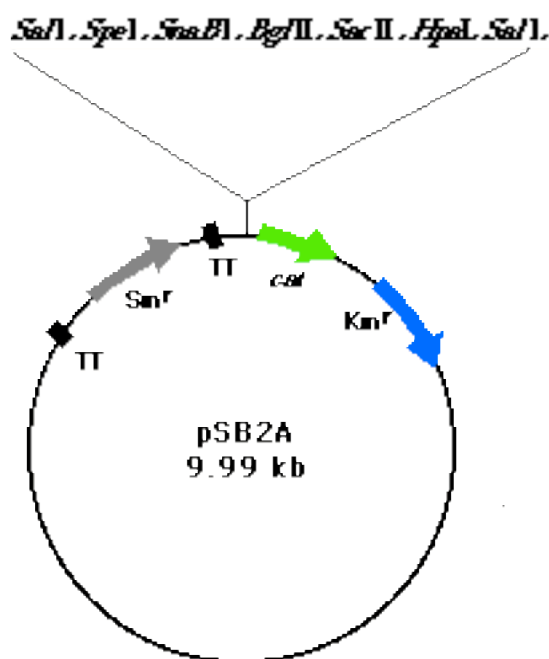
contenant les protéines précipitées, est ensuite lavé 3 fois avec 200  $\mu$ L d'acétone froid (resuspension et centrifugation 3 minutes à 15000rpm, 4°C), puis séché sous vide afin d'éliminer les restes d'acétone. Les culots sont alors resuspendus sous agitation (20 min, 25°C) dans 40  $\mu$ L d'un tampon contenant 1.5% de SDS, 100 mM de Tris pH=8, 1 mM d'EDTA, un cocktail d'antiprotéases (PMSF 1 mM et Complete Protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim ref 1836145) (1 pastille pour 10 ml)), et 15 mM d'4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS). L'AMS bloque par alkylation le groupement -SH des thiols réduits (les cystéines impliquées dans des ponts disulfure au moment du traitement TCA ne sont pas réactives). Les extraits sont ensuite centrifugés pendant 3 minutes à 14000 g et le surnageant est récolté.

## **b) Western Blot**

La concentration des extraits protéiques est déterminée par la méthode de Bradford (comme décrit précédemment). Les échantillons sont ensuite préparés par ajout d'une solution tampon de Laemli x4 (2% SDS, 62.5 mM Tris-Cl pH 8.7, 10% glycérol, 0.1% de bleu de bromophénol). Généralement 10 à 20  $\mu$ g de protéines sont déposés par puits. Le  $\beta$ -mercaptoethanol (5% final) est rajouté ou non comme indiqué (conditions réductrices ou non). Les échantillons sont incubés 5 minutes à 95°C, puis déposés sur gel SDS Page 15% (acrylamide/bisacrylamide 30:0,4).

Les protéines sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (Protran, Schleicher et Schuell) 45 min à 120 mA. Celle-ci est saturée par un mélange de lait écrémé (5% p/v) et de PBS 1X (NaCl 150 mM, Phosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM), pH 7,4 10 mM), Tween-20 0,1 % (v/v) pendant 30 min à température ambiante. L'immunodétection est réalisée avec un anticorps monoclonal de souris anti-myc (fourni par C. Cremignon, SPI/CEA) (dilué au 1/2500<sup>ème</sup> dans un mélange PBS 1X, Tween-20 0,1% (v/v) pendant 1h, puis après 3 lavages de 5 min au PBS 1X, Tween-20 1 % (v/v), avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à une peroxydase (Amersham-Pharmacia) (dilué au 1/2500<sup>ème</sup>) pendant 1h. Après une nouvelle série de lavages ( 3 fois 5 min avec du PBS 1X, Tween-20 0,3 % (v/v) et 3 fois 5 min au PBS 1X, Tween-20 0,1 % (v/v)), la révélation est réalisée à l'aide du kit de détection ECL-Plus (Amersham-Pharmacia), en suivant les instructions du fournisseur.

## ANNEXES

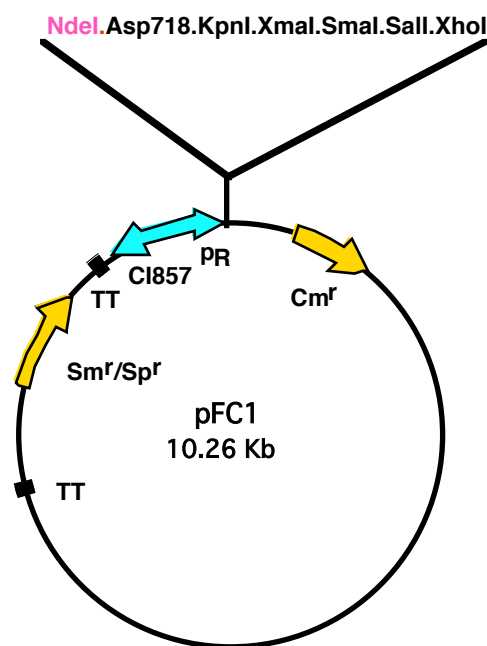


**Figure 81 : Vecteur réplcatif pSB2A.** TT : terminateur de transcription ; Km<sup>r</sup> : cassette de résistance à la kanamycine ; Sm<sup>r</sup> : cassette de résistance à la streptomycine.

Le vecteur pSB2A a initialement été construit au laboratoire pour des tests de promoteurs. Ce plasmide ne possède pas de promoteur au niveau du site de clonage. Il se réplique dans *Synechocystis* à raison d'une copie par copie de chromosome.

Ce plasmide peut être utilisé pour des tests de complémentation de mutants inactivés. Le clonage du même gène dans pSB2A dans le mutant correspondant permet d'obtenir une expression identique à celle d'une souche sauvage.





**Figure 82 : Caractéristiques du vecteur réplcatif pFC1 [25].** TT : terminateur de transcription ; Cm<sup>r</sup> : cassette de résistance au chloramphénicol; Sm<sup>r</sup> : cassette de résistance à la streptomycine ; pR promoteur fort contrôlé par *ci857* (répresseur thermosensible).

pFC1 possède la machinerie de réplication issue du plasmide à large spectre d'hôte RSF1010, et les signaux de thermorégulation de l'expression génique provenant du bactériophage lambda.

Les cellules qui ont reçu le plasmide deviennent résistantes à la streptomycine (Sm) et chloramphénicol (Cm) et répliquent pFC1 de façon stable.

Si la phase codante d'un gène est clonée au site de restriction *Nde* I (CATATG) qui reconstitue le codon initiateur (ATG) de la traduction. l'expression de ce gène est alors gouvernée par le promoteur fort, *pR*, qui est lui même contrôlé par le répresseur thermosensible codé par le gène *ci857*.

A 27-30°C, le répresseur bloque complètement l'activité du promoteur : la protéine à analyser n'est pas produite.

A 39-40°C, le répresseur est dénaturé et donc totalement inactif : la protéine à analyser est abondamment synthétisée et peut devenir l'une des protéines majoritaires de la cellule.

# **ARTICLE I**

## **Cadmium Triggers a Yin Yang Reprogramming of the Metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the Control of the Slr1738 Regulator**

Laetitia Houot<sup>a</sup>, Martin Floutier<sup>a,b\*</sup>, Benoit Marteyn<sup>a\*</sup>, Pierre Legrain<sup>b</sup>, Corinne Cassier-Chauvat<sup>a,b</sup> and Franck Chauvat<sup>a,1</sup>

Service de Biologie Moléculaire Systémique<sup>a</sup>, URA 2096 CNRS<sup>b</sup>, DBJC, CEA Saclay  
91191 Gif sur Yvette CEDEX, France

1 Corresponding author Franck Chauvat

Telephone: 33 1 69 08 78 11

Fax : 33 1 69 08 80 46

e-mail address [franck.chauvat@cea.fr](mailto:franck.chauvat@cea.fr)

\* These authors contributed equally to this work

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)) is Chauvat Franck . ([franck.chauvat@cea.fr](mailto:franck.chauvat@cea.fr))

Running title : *Synechocystis* integrated responses to Cd

## Abstract

Cadmium is a persistent pollutant that threatens biological organisms, including cyanobacteria that support a large part of the food chain and oxygen renewal. We have analyzed the global responses to Cd, and other stresses (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe and Zn), in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. We report that Cd triggers the simultaneous downregulation of most key genes operating in (i) photosynthesis (PS) that normally provides ATP and NADPH required for assimilation of inorganic nutrients; (ii) ATP-consuming carbon and nitrogen assimilation, the coordination of which is crucial to cell metabolism; and (iii) translation machinery, a major consumer of C and N assimilates. These responses are accompanied by the upregulation of many genes involved in protein maturation and degradation, and stress tolerance. We view the Cd responses as a “Yin Yang” integrated metabolic reprogramming, which we found to be controlled, at least in part, by the Slr1738 regulator. As the Yin process, the ATP-sparing downregulation of cell metabolism likely limits Cd uptake and the poisoning incorporation of Cd into metalloenzymes. As the compensatory Yang process, the PS breakdown, which impairs ATP production, liberates nutrient assimilates that become available for the synthesis of Cd-toxicity protecting enzymes, among which we found the Slr0946 arsenate reductase.

## Introduction

Photosynthetic organisms support much of the life on Earth, in using solar energy to renew the oxygenic atmosphere and to make up organic assimilates that are crucial to the food chain. These crucial organisms are challenged with the toxic reactive oxygen species (ROS) generated by respiration and photosynthesis {Nishiyama, 2001 #3902}, and by toxic metals, such as cadmium, that constitute a persistent threat of food quality because they cannot be degraded. Cadmium, is an abundant element in Earth's crust where it is often combined with sulfur (cadmium sulfate, cadmium sulfite). Cadmium, Cd, is also intensively spread out in the environment as a by-product of zinc mining, as well as through the burning of fossil fuel and municipal wastes; the dispersal of sewage sludge and phosphate fertilizers {Satarug, 2003 #4665}, and the manufacturing of paints, batteries and screens. Then, Cd is transferred to the food chain and bio-accumulated ultimately in human {Satarug, 2003 #4665} where it has a half-life greater than 20 years {Andrew, 2003 #4664} and causes various diseases by as yet unclear processes {Waisberg, 2003 #4669}.

By contrast, other abundant metals such as zinc and iron are essential cofactors in a wealth of metalloproteins including zinc-finger containing transcription factors {Rosenzweig, 2002 #4692} and iron-sulfur centers containing metabolic enzymes {Bryant, 1994 #4122}. These "biological" metals can become toxic too, when occurring in excess, through the poisoning replacement of the cognate metal co-factor of diverse enzymes, a phenomenon sometimes leading to oxidative stress {Stohs, 1995 #3880}.

Cyanobacteria are well suited organisms to investigate the interrelations between metal toxicity and oxidative agents, since they are the sole organisms capable to perform the two metal-requiring ROS-generating processes, photosynthesis and respiration {Nishiyama, 2001 #3902}, in the same compartment {Bryant, 1994 #4122}. Furthermore, cyanobacteria, the most abundant photosynthetic organisms on Earth {Ferris, 1998 #3935}, are making up a major contribution to the production of oxygen {Partensky, 1999 #3746} and of carbon and nitrogen assimilates for the food chain {Zehr, 2001 #3974}. Moreover, in agreement with they likely being the ancestor of chloroplast {Gray, 1993 #3963}, cyanobacteria share a wide range of genes in common with plants {Martin, 2002 #4096}. Thus, lessons learned from stress responses in cyanobacteria will also greatly facilitate the understanding of how plant cells face environmental challenges.

Using the unicellular model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 (hereafter referred to as *Synechocystis*) that possesses a small sequenced genome {Kaneko, 1996 #3273} (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>), easily manipulable with replicating plasmids {Mazouni, 1998 #3688; Poncelet, 1998 #3643; Mazouni, 2004 #4678}, we have analyzed the global responses of photosynthetic cells challenged with Cd, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (the paradigm ROS agent), Fe (starvation or excess) and Zn (excess), through (i) DNA microarrays; (ii) absorption spectroscopy; (iii) targeted gene inactivation and (iv) assays of cell fitness. We show that Cd triggers a “Yin Yang” reorganization of the cyanobacterial metabolism, under the control of the Slr1738 regulator. The “Yin” ATP-sparing downregulation of cell metabolism is likely limiting Cd uptake and the poisoning incorporation of Cd in place of the cognate metal cofactor of metalloenzymes. The compensatory “Yang” breakdown of the PS machinery, which impairs ATP production, is liberating nutrient assimilates that become available for the synthesis of Cd-toxicity protecting enzymes, among which we found the Slr0946 arsenate reductase.

## RESULTS

### **Overview of the Global Stress Responses: Transcriptional Regulations Elicited by Cd Are Slower and More Sustained Than Those Triggered by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

The transcriptome approach was used to characterize the kinetics of the global change in *Synechocystis* cellular viability and gene expression in response to continuous exposure to CdSO<sub>4</sub> (50  $\mu$ M) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM). Total RNA were isolated from treated and non-treated cells, and analyzed with DNA glass microarrays carrying either 2847 (CyanoCHIP 1.2) or 2950 (CyanoCHIP 2.0) of the 3284 ORFs of *Synechocystis* as described in Methods. We focused our attention on genes that exhibited a change in expression of at least 1.9 fold, a common cutoff value we verified to be relevant since the standard versus standard hybridization control experiment we performed showed 100% data points with a ratio of expression falling between 0.7 and 1.6.

Our data (Table 1, see also supplemental Table 1 and supplemental Table 2) showed that the Cd-mediated changes in the transcription profile (687 genes differentially expressed in at least two of the nine sampling time points) can be divided in three main kinetic phases: early, middle and late. The early phase was moderate since only 98 genes responded to Cd during the first 75 min of treatment, and the changes were mostly up-regulation. The middle phase

occurring between 90 to 360 min of treatment was the main phase with about 500 genes being differentially expressed, which were equally distributed between up- and downregulated genes. The late phase, occurring sometime after 360 min and involving massive cell death (90%), concerned a small number of genes (less than 60 at 960 min), of which two-third were stimulated and one-third were turned down.

In the case of the transcriptional responses to  $H_2O_2$  (626 genes affected in at least two of the five sampling time points) only two phases were observed (Table 1). The early (massive) response encompassing the time points 15 min and 30 min (about 700 genes equally distributed between up- and down-regulation) and the late response occurring between 180 min and 420 min of treatment (204 genes controlled, 132 positively, 72 negatively) during which most fast responsive genes returned to their normal level of expression. Thus, the global responses to Cd were slower and more sustained than those to  $H_2O_2$ . Also interestingly, we found that about fifty percent of the genes that responded to Cd or  $H_2O_2$  have no predicted function (Table 2, supplemental Table 1 and supplemental Table 2), emphasizing on the limitation of our current knowledge of cyanobacterial genomes. Consequently, reports on the comparisons of expression profiles under various conditions are wellcome as a step towards the future identification of the function of orphan genes.

Having in mind that metals can displace the cognate metal cofactor from metalloenzymes, thereby eliciting oxidative stress {Stohs, 1995 #3880}, we also analyzed the global transcriptional responses to drastic changes in Zn or Fe availability (Tables 1 and 2, see below).

### **Cadmium Antagonistically Controls the Genes Operating in Protein Synthesis (Downregulation), and Protein Maturation and Degradation (Upregulation)**

Among the earliest responses to Cd (noticeable within the first 30 min of exposure) was the upregulation of chaperones and proteases genes (Table 2A), the number of which increased during the middle (massive) phase of responses (see above). This regulation was accompanied with a drop in expression of most ribosomal proteins genes that occurred slightly later (noticeable at 90 min). By contrast, most aminoacyl-tRNA synthetases genes did not respond to Cd (see supplemental Table 2). Considering that these genes, not affected by Cd, are predicted to be expressed much less efficiently than ribosomal genes {Mrazek, 2001 #4705}, downregulated by Cd, it is conceivable that Cd might preferentially downregulate the

genes encoding products whose synthesis represents a metabolic burden to the cells.

Similarly, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> downregulated ribosomal protein genes (Table 2A), and did not affect aminoacyl-tRNA synthetase genes (see supplemental Table 2). However, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> had a contrasted influence on genes involved in protein maturation and degradation, in regulating equal numbers of them positively and negatively. Interestingly, Zn excess partly mimics the Cd-mediated regulation of genes involved in protein synthesis (negative control), and protein folding and turn over (positive control), which were little affected by Fe availability.

### **Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Downregulate Redox Metabolism in Acting More Specifically on Photosynthesis (Cd) or Respiratory (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Genes**

In oxygen-evolving photosynthetic organisms two chlorophyll-containing protein complexes, the photosystems, cooperate to use light energy to transfer electrons from water to NADP<sup>+</sup> and generate ATP that power up the assimilation of inorganic nutrients from the environment. The photosystem II (PSII) carries out the oxidation of water and the reduction of plastoquinone. Its phycobilisomes (PBS) antennae, accounting for up to 30% of the *Synechocystis* proteins {Mrazek, 2001 #4705}, are composed of light-absorbing phycobiliproteins and non-pigmented "linker polypeptides" enabling PBS assembly. The photosystem I (PSI) functions as a plastocyanin-ferredoxin oxidoreductase in standard condition (normal BG11 medium) where copper and iron are readily available. By contrast, plastocyanin (PetE, Sll0199) is replaced by cytochrome c6 (PetJ, Ssl1796) in case of Cu limitation, while ferredoxin (FedI, Ssl0020) is replaced by flavodoxin (IsiB, Sll00248) in response to Fe deficiency {Cavet, 2003 #4694}. The cytochrome b6/f complex transfers electrons between PSII and PSI (linear photosynthesis) and is also required for cyclic electron flow around PSI (electron transfer from ferredoxin or NADPH to plastoquinone, and subsequently to cytochrome b6/f). Both linear and cyclic electron flow establish the transmembrane gradient of protons required for ATP synthesis (driven by the F-type ATPase) {Bryant, 1994 #4122}. The linear photosynthesis also generates NADPH and, in case of light excess, toxic reactive oxygen species (ROS) as by products {Munekage, 2004 #4702}.

One of the most striking aspect of the responses to Cd, noticeable 75-90 min after the beginning of exposure, is the downregulation of all PS complexes, namely: PSI, PSII, PBS, cytochrome b6/f and ATP synthase (Table 2B). The validity of these data was substantiated by the facts that, among other data fitting the literature (see below), (i) the co-expression of

operonic genes (see for instance the operons *psaAB*, *psbCD1*, *apcABC* and *sll1321-atpIHGFDACBE* incorporating the unknown gene *sll1321* upstream of *atpI*), and (ii) the antagonistic iron regulation of *fedI* (*ssl0020*) and *isiB* (*sll0248*) on one hand, and of *petE* (*sll0199*) and *petJ* (*sll1796*) on the other hand. Consistent with the downregulation of PS genes, most pigment synthesis genes were turned down by Cd (Table 2B), namely: *hemA*, *hemL*, *hemB*, *hemE*, *hemF*, *hemN*, *chlN*, *chlB*, *chlL*, *por*, *ho1*, *ho2*, *cblX*, *crtH*, *crtR*, *crtD*-homolog and *alg*-homolog. Also consistent with PBS downregulation, the two high-light inducible *nblA* genes (*ssl0452-ssl0453* operon) involved in PBS degradation {van Waasbergen, 2002 #4726} appeared to be upregulated by Cd (Table 2B). Similarly, the other three high-light inducible genes *hliB* (*ssr2595*), *hliC* (*ssl1633*) {He, 2001 #4714} and *isiA* (*sll0247*) {Yeremenko, 2004 #4713} were upregulated by Cd (Table 2B), indicating that Cd-exposed cells are becoming light sensitive. Indeed, we found that increasing the intensity of the otherwise physiological illumination at the onset of the Cd-treatment, led to a significant decrease of cell viability (Figure 2C).

The aspects of Cd toxicity resembling light stress are likely due to oxidative stress since they could be elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> too. These common responses included (Table 2B) the downregulation of PBS genes (*apcA*, *apcB*, *apcC*, *apcE* and *apcF*) and the concomitant upregulation of high-light inducible genes (*nblA*, *hliC*, and *isiA*). Unsurprisingly, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mimicked high-light stress more efficiently than Cd, in upregulating several high-light inducible genes that did not respond to Cd, namely (Table 2B): *hliA* (*ssl2542*), *hliD* (*ssr1789*), and the protease genes *ctpA* (*slr0008*) and *ftsH* (*slr0228* and *slr1604*) involved in the high-light induced turnover of the D1 protein of PSII {Silva, 2003 #4710}. Also interestingly, many PS genes downregulated by Cd were actually upregulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, namely (Table 2B): PSII (*psbB*, *psbJ*, *psbV* and *psbU*), PSI (*psaF*, *psaJ*, *psaD*, *psaI*, *psaM*) and PBS (*cpcC1*, *cpcC2* and *cpcD*).

Similarly to Cd, Zn downregulated numerous PS genes (PBS, PSII, PSI and pigment synthesis, but not ATPase genes), and upregulated genes involved in light tolerance and protein turnover (Table 2B). By contrast, Fe stress controlled a few PS genes that responded antagonistically to excess and limitation of Fe. Also interestingly, the differential regulation of the cytochrome b6/f genes (Table 2B), encoding the predominant (*petC1*) or accessory (*petC2* and *petC3*) Rieske iron-sulfur proteins {Schneider, 2004 #4707}, strongly suggests that alternative b6/f complexes are synthesized in response to changing environmental conditions.

In cyanobacteria, respiration that generates ATP in the dark {Bryant, 1994 #4122} is



performed in the same compartment as photosynthesis, and these processes share many effectors in common: plastoquinone, plastocyanin, cytochrome c6, cytochrome b6/f and NADH dehydrogenase (NDH) complexes {Duran, 2004 #4687}. The mitochondrial-type NDH-1 complex {Zhang, 2004 #4716}, encoded by the genes *ndhA* to *ndhL*, also operates in CO<sub>2</sub> uptake (*ndhD3* and *ndhF3* proteins together with *cupA* and *sll1735*) and PSI cyclic electron flow (*ndhD3*, *ndhF3*, *cupA*, *sll1735* plus the *ndh* single genes). The simpler bacterial-type enzyme (NDH-2, or Ndb complex), encoded by *ndbABC*, also behaves as sensors of the redox state of the plastoquinone pool {Howitt, 1999 #4715}. The *Synechocystis* respiratory machinery also contains three terminal oxidases: two cytochrome aa3-type cytochrome c oxidases encoded by *cta* genes, and a quinol oxidase encoded by the *cyd* operon {Cavet, 2003 #4694}. Most *ndh*, *ndb* and *cta* genes were downregulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 2B) and little affected by Cd, strongly suggesting that the respiratory activity is decreased by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not Cd. Together with the fact that ATPase genes were all turned down by Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 2B), these findings indicate that Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> downregulate redox metabolism and ATP production by preferentially turning down either photosynthesis (Cd) or respiration (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **Spectroscopic Confirmation that Cd Elicits a More Intense Decline of the Photosynthetic Machinery than H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Collectively, the above mentioned data showing that Cd- and Zn-stresses turned down most photosynthesis genes and simultaneously upregulated protein degradation genes, suggested that Cd and Zn-excess decrease the cellular content of the PS machinery. We also anticipated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to elicit a lower decline of the PS apparatus as compared to Cd and Zn, since H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> downregulated a smaller number of PS genes, and actually induced a few PSII and PSI genes. These predictions were all validated by a global method, i.e. absorption-spectroscopy (Figures 1A and 1B), which shows that the cellular content of colored PS pigments was decreased strongly in response to Cd- and Zn-stresses (Figures 1A and 1B) and weakly in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 1D). As control experiments, we have verified that excess of Fe (with little influence expression of the PS genes) or cobalt did not alter pigment content (Figures 1C and 1F).

## Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Disturb Metal Homeostasis and Generate Oxidative Stress

A large number of metal transport genes responded to Cd, indicating that Cd disturbs metal homeostasis (Table 2C). The nine genes cluster involved in the tolerance to Ni (*nrsBACD* operon, slr0793 to slr0796), Co (*coaRT* divergon, slr0794 and slr0797) and Zn (*ziaBR* dicistronic operon slr0793-slr0792 and *ziaA* export ATPase slr0798) was upregulated by Cd (Table 2C). The relevance of our data is attested by the Zn-mediated opposite regulations of the two genes *znuA* (slr2043, downregulation) and *ziaA* (upregulation) that operate in Zn uptake and export, respectively {Cavet, 2003 #4694; Thelwell, 1998 #4689; Garcia-Dominguez, 2000 #3896}. Similarly, *znuA* and *ziaA* were antagonistically controlled by Cd. This finding, together with the sequence homology of ZiaA with Cd-transporting CdaA ATPases {Rensing, 1999 #4732}, suggests that Cd might be transported via Zn transport systems. In addition (Table 2C), Cd upregulated the *corR-corT* divergon operating in Co efflux, and it downregulated the *cbi* cluster (slr0381 to slr0385) involved in the biosynthesis of the Co-dependent vitamin B12 (cobalamin). Interestingly, we found that the slr0037 gene encoding a protein (CbiX) presumably involved in cobalamin biosynthesis {Raux, 1998 #4728} was co-regulated with the *cbi* cluster.

The importance of iron, critical to metalloproteins containing a heme or an iron-sulfur center, is evident from the large number of *Synechocystis* genes (more than 20) dedicated to Fe acquisition (*feoB*, *fec*, *fhu* and *fut* genes). As anticipated from previous Northern blot data {Kato, 2001 #3898}, most Fe uptake genes responded positively to Fe starvation and negatively to Fe excess (Table 2C). The relevance of our data is further supported by the finding that the *fed* genes, encoding the iron-sulfur center proteins ferredoxins, were turned down by iron deficiency (Table 2D), as expected {Singh, 2003 #4688}. Very interestingly, a larger number of Fe acquisition genes were upregulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (most genes) than by Cd (less than half of the genes), suggesting that Fe uptake is accelerated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> more efficiently than by Cd.

Thiol-disulfide exchange reactions control the activity of a wealth of antioxidant enzymes, such as the peroxidases (encoded by *gpx* and *ahpc* genes {Hosoya-Matsuda, 2005 #4730}) and the glyoxalases (*glo* gene products). The underlying redox control of reversible disulfide-bond formations is mediated by the enzymes thioredoxins (Trx) and glutaredoxins (Grx) that exchange reducing equivalents between their active cysteines and the regulatory cysteines of target proteins. Oxidized thioredoxins are reduced by NADPH and thioredoxin reductase (*trxB*, slr0600) or by the ferredoxin-thioredoxin reductase (*ftrC*, slr0554), while oxidized

glutaredoxins are reduced by glutathione using electrons donated by NADPH. Most of these antioxidant genes were upregulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 2D), as expected. In addition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upregulated most Fe uptake genes (Table 2C), as well as (Table 2D) the *suf* genes (slr0088, slr1417 and cluster slr0074-slr0076) involved in iron-sulfur cluster biogenesis {Wang, 2004 #4701}. By analogy to what occurs in oxidative-stressed *E.coli* cells {Benov, 1998 #4727} {Zheng, 2001 #4603} {Djaman, 2004 #4729}, the above mentioned upregulations suggest that Fe uptake is accelerated to supply Fe atoms for the reconstitution of oxidized iron-sulfur clusters. This Fe-consuming repair process likely leaves no free Fe atoms available for oxidative Fenton chemistry. Similarly to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cd upregulated antioxidant and *suf* genes, and Fe-uptake genes (less than half of those induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Tables 2C and 2D). These data suggest that Cd too is mediating oxidative stress incorporating damages to Fe-S center proteins, and that extra Fe atoms required for the repair of Fe-S centers are not entirely provided by the presumably slight increase in Fe uptake.

Collectively, our results suggest that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and Cd-treated cells are using two alternative strategies to provide extra Fe atoms required for the synthesis and/or repair of Fe-containing metalloproteins involved in stress tolerance. Cd-stressed cells are mostly recycling the Fe atoms liberated upon the large decline (Figure 1A) of the Fe-rich photosynthetic machinery (21-23 iron atoms per PS unit, see {Straus, 1994 #4693}), whereas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells undergoing a limited PS-decline (Figure 1D) are mostly accelerating Fe uptake from the medium (inferred from Table 2C).

### **Iron Availability Controls the Cd-Elicited Decline of Cell Viability and PS Machinery**

The above mentioned data suggest that Fe availability can influence cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Cd, as well as the extent of the Cd-elicited decline of the PS machinery. As anticipated, we found that the addition of Fe in the medium at the onset of the stresses increases cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Cd (Figures 2A and 2B), and prevents the Cd-elicited decline of the PS machinery (Figure 1C). As a negative control, we verified that cobalt (Co) was unable to mimick the Fe-mediated protection against the Cd-elicited decrease of both cell survival (Figure 2A) and PS machinery (Figure 1F).

### **The Slr0946 Arsenate Reductase Contributes to Cadmium Tolerance**

The *arsBHC* tricistronic operon (slr0944 to slr0946) promoting arsenic resistance {Lopez-Maury, 2003 #4690} {Li, 2003 #4691} was rapidly and continuously upregulated by Cd (Table 2C), suggesting that these genes might be involved in Cd tolerance. To confirm this inference, we have deleted the arsenate reductase gene *arsC* (slr0946) as described in Methods, and found the corresponding fully-viable *arsC* null mutant to be more sensitive to Cd than the WT strain (Figure 3). This finding clearly identifies the Slr0946 arsenate reductase has a key factor in the tolerance to cadmium.

### **Cd Downregulates Carbon Metabolism Genes, Many of Which Encode ATP-Requiring Enzymes**

Cyanobacteria have evolved an extremely effective CO<sub>2</sub> concentrating mechanism (CCM) for the assimilation of inorganic carbon (Ci). The CCM system includes {Badger, 2003 #4704} (i) two CO<sub>2</sub> uptake systems associated with NADH-dehydrogenase complex I, namely: NDH-I<sub>3</sub>, encoded by the operon *ndhF3* (sll1732), *ndhD3* (sll1733) and *cupA* (sll1734), and NDH-I<sub>4</sub>, encoded by the *ndhF4-ndhD4* operon (sll0026-sll0027) and *cupB* (slr1302); as well as (ii) two bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) transporters, namely: an ATP-consuming transporter (*cmpABCD* operon, slr0040 to slr0044) and a sodium-dependent system (*sbtA*, slr1512 and *sbtB*, slr1513). The intracellular HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is subsequently used by the carbonic anhydrase enzyme (*cca*, slr1347) inside the carboxysome (*ccmK-N* operon, sll1028 to sll1032, and monocistronic genes *ccmK4*, slr1839; *ccmO*, slr0436 and *ccmK3*, slr1838) to elevate CO<sub>2</sub> around the Rubisco enzyme (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase) encoded by *rbcL* (slr0009), *rbcS* (slr0012) and *rbcX* (slr0011).

Most of these carbon acquisition genes were downregulated by Cd (Table 2E), sometimes lately (*ndhF3* and *ndhD3*, Table 2B), to the exception of the *ccmO* and *ccmK3* genes (not affected, see supplemental Table 2). Similarly, the key Ci assimilation genes encoding phosphoribulokinase (*prk*, sll1525) and phosphoenol pyruvate carboxylase gene (*ppc*, sll0920) were also downregulated by Cd (Table 2E). Together with the constitutive expression of the Ci-assimilation regulator NdhR, encoded by the low-Ci inducible gene sll1594 {Figge, 2001 #3837}, these results indicate that Cd treated cells are not suffering from Ci starvation.

The two molecules of 3-phosphoglycerate (3-PG) produced by the Rubisco activity can enter the glycolytic cycle (<http://www.genome.jp/KEGG/>), and be converted into

phosphoenol-pyruvate (PEP) and pyruvate by the sequential action of phosphoglycerate mutase (*gpmA*, slr1124 and slr1945), enolase (*eno*, slr0752) and pyruvate kinase (*pyk*, slr1275 and slr0587). These genes were all turned down by Cd (Table 2E), except *pykI* (slr0587). Alternatively, the 3-PG can be converted into glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) by the sequential action of phosphoglycerate kinase (*pgk*, slr0394) and the isoform 2 of G3P-dehydrogenase (*gap2*, slr1342) {Koksharova, 1998 #3930}. These two gluconeogenesis genes were downregulated by Cd, along with the glucose-1-phosphate adenylyltransferase gene (*glgC*, slr1176) involved in glycogen synthesis. Similarly, the glycolytic enzymes generating G3P from glucose were also negatively regulated by Cd (Table 2E), namely: phosphoglucomutase (*pgm*, slr0726), phosphofructokinase I (*pfkA*, slr1196), fructose 1,6-biphosphatase I (*fbpI*, slr2094) and fructose biphosphate aldolase II (*fbaA*, slr0018). The exceptions were the glucose-6-phosphate isomerase (*pgi*, slr1349, constitutive), phosphofructokinase II (*pfkA*, slr0745, not affected), fructose 1,6-biphosphatase II (*fbpII*, slr0952, Cd-induced) and fructose-biphosphate aldolase I (*fdA*, slr0943, constitutive).

Like pyruvate-generating glycolytic genes (see above), pyruvate-consuming genes: pyruvate dehydrogenase (*pdhA*, slr1934; *pdhB*, slr1721; *pdhC*, slr1841 and *pdhD*, slr1096), PEP carboxylase (see above) and isocitrate dehydrogenase (*icd*, slr1289) were also downregulated by Cd (Table 2E). These data suggest that Cd downregulates citrate synthesis and conversion into 2-oxoglutarate that connects carbon and nitrogen assimilation pathways. The predicted decline in 2-oxoglutarate led us to anticipate that Cd is also turning down nitrogen assimilation, an inference that was substantiated by the Cd-mediated downregulation of numerous genes operating in nitrogen metabolism (see below).

Because many of the C metabolism genes downregulated by Cd encode ATP-consuming enzymes such as *cmpABCD*, *fbpI*, *pgk*, *pfkA*, *prk*, *pykI*, it is tempting to speculate that this negative regulation is part of a global ATP-sparing response to the Cd stress. This interpretation is substantiated by the Cd-elicited downregulation of a variety of genes encoding ATP-requiring enzymes involved in metal acquisition (see above) or nitrogen metabolism (see below).

Similarly to Cd, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> downregulated many Ci acquisition genes (Table 2E): *ccm*, *cmp* and *sbt*, as well as numerous carbon metabolism genes: *pgk*, *gpmB* (slr1124 and slr1945), *eno* (slr0752), *fbpI*, *carA* (slr1498), *carB* (slr0370), *pdhA*, *pdhB*, *pdhC* and *pdhD*. By contrast, Fe and Zn downregulated a few Ci acquisition genes *cmp* and *sbt* (Fe) and *ccm* (Zn), and had very little influence on carbon metabolism genes.

## Cd Downregulates Nitrogen Metabolism Genes, Many of Which Encode ATP-Consuming Enzymes

In *Synechocystis*, nitrogen (N) can be assimilated from inorganic sources, ammonium (the preferred N source) and nitrate, or from an organic source, urea. The ammonium permease system is coded by the genes *amt123* (sll0108, sll1017 and sll0537), while the ATP-dependent uptake systems for nitrate and urea are encoded by the genes *nrtABCD* (that belong to the five genes operon sll1450-sll1454 encompassing the nitrate reductase gene *narB*, sll1454) and *urtABCDE* (slr0447, slr1200, slr1201, sll0764 and sll0374), respectively. Intracellular nitrate is sequentially reduced into nitrite (by nitrate reductase NarB) and ammonium (by nitrite reductase, *nirA*, slr0898), while urea is degraded in ammonium and CO<sub>2</sub> (by urease, *ureABCDEFGF*, slr1256, sll0420, sll1750, sll1639, slr1219, slr1899 and sll0643). We found (Table 2F) that *nrtABCD*, *narB*, *nirA*, *amt1*, *amt2* and *urtABC* were negatively regulated by Cd, as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which also downregulated *ureA* (slr1256) and *ureF* (slr1899).

Ammonium is assimilated by the following enzymes (<http://www.genome.jp/KEGG/>): (i) the ATP-requiring carbamoyl phosphate synthase (*carAB* genes, sll1498 and sll0370, regulated (negatively) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only, Table 2F); (ii) glutamate (Glu) dehydrogenase (*gdhA*, slr0710, regulated (positively) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but not Cd, Table 2F) that catalyzes the amination of 2-oxoglutarate to Glu; and (iii) the sequential action of glutamine synthase (GS) that catalyzes the ATP-dependent ligation of Glu and ammonium yielding glutamine (Gln), and of Glu synthase (GOGAT) that transfers the amido group of Gln to 2-oxoglutarate rendering two Glu molecules. As shown in Table 2F, Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> downregulated the two GS genes *glnA* (slr1756) and *glnN* (slr0288), and, consistently, these noxious agents upregulated *gifA* (ssl1911) and *gifB* (sll1515) encoding the inhibitor of GlnA activity {Garcia-Dominguez, 2000 #4697}. By contrast, several genes involved in Glu production were affected by neither Cd nor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (see supplemental Table 2): *gltBD* (sll1502 and sll1027, NADH-requiring GOGAT), slr2079 (glutaminase) and sll1561 (proline oxidase), while *glsF* (sll1499, ferredoxin-dependent GOGAT) was regulated (negatively) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only (Table 2F).

Many genes operating in Glu- and Gln-dependent N distribution were negatively regulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 2F). These genes are involved in (i) peptidoglycan synthesis: *murI* (slr1746); (ii) arginine synthesis: *argB* (slr1898, ATP-dependent N-acetylglutamate kinase), *argG* (slr0585, ATP-dependent argininosuccinate synthase) and *argH* (slr1133, argininosuccinate



lyase); (iii) N storage under the form of the cyanophycin polymer of arginine-aspartate: *cphA* (slr2002, ATP-requiring {Aboulmagd, 2001 #4706} cyanophycin synthetase); (iv) proline synthesis: *proA* (sll0373, ATP-dependent gamma-glutamyl phosphate reductase); and (v) synthesis of vitamin B12 and photosynthetic pigments (Table 2B): *hemA* (slr1808), *hemF* (sll1185) and *hemL* (sll0017). Several of these genes were also turned down by Cd (Tables 2B and 2F): *murI*, *argB*, *cphA*, *hemA*, *hemF* and *hemL* (together with *hemE* (slr0536) and *hemN* (sll1876), unresponsive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

A noticeable exception to the Cd-elicited downregulation of glutamate utilization genes is the moderate and slow induction of the glutathione (GSH) synthase encoding gene (*gshB*, slr1238, Table 2D), an observation suggesting that Cd chelation by GSH is not an important defense mechanism in *Synechocystis*, unlike what observed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* {Fauchon, 2002 #4668}.

Also interestingly, numerous N acquisition and assimilation genes were also regulated by Fe stresses (but not Zn), suggesting that Fe homeostasis and nitrogen assimilation are intrinsically connected.

Collectively, the downregulation of numerous key genes encoding ATP-consuming enzymes involved in carbon and nitrogen metabolisms elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Cd are likely part of a global ATP-sparing response enabling cells to compensate for the decline in ATP production caused by the strong waning of the photosynthetic machinery (Cd), or the moderate PS-decline combined with the downregulation of respiration (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **Cd Downregulates the Two Sulfur Assimilation Genes Encoding ATP-Dependent Enzymes**

*Synechocystis* harbors five genes predicted to operate in sulfate reduction and cysteine synthesis, namely: *met3* (slr1165, sulfate adenylyltransferase), *cysC* (slr0676, adenylylsulfate kinase), *cysH* (slr1791, phosphoadenosine phosphosulfate reductase), *sir* (slr0963, ferredoxin-sulfite reductase), *cysE* (slr1348, serine acetyltransferase) and *cysM* (sll0712, cysteine synthase). The *cysH*, *sir*, *cysE* and *cysM* genes, and the four sulfate-transport genes *sbpA* (slr1452), *cysT* (slr1453), *cysW* (slr1454) and *cysA* (slr1455) responded to neither Cd nor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Collectively, these data suggest that cells challenged with Cd or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are not suffering from sulfur starvation. By contrast, the *met3* and *cysC* genes encoding the two ATP-requiring enzymes of the cysteine-synthesis pathway appeared to be downregulated by Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(see supplemental Table 2). These data substantiate the Cd- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-elicited downregulation of ATP-consuming metabolic enzymes (see above), a global ATP-sparing response attempting to compensate for the decline in photosynthesis (elicited by Cd and, to a lesser extent, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and respiration (mostly elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **Prominent Role of the Slr1738 Regulator in the Transcriptional Responses and the Survival to Cd**

To further demonstrate that the Cd-elicited decline of the photosynthetic machinery is a direct physiological response rather than a side effect of cell damage, we searched for a hypothetical transcriptional regulator controlling this process. We became interested in the *slr1738* regulator gene because it was upregulated by Cd (Table 2C) that elicits a strong PS decline (Figure 1A), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 2C and {Li, 2004 #4673}) that triggers a weaker PS waning (Figure 1D). We inactivated *slr1738* (see Methods) and found the corresponding fully viable null-mutant ( $\Delta$ *slr1738*) to be more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and paraquat than the WT strain (Figures 4A and 4B). The oxidative-stress resistance of  $\Delta$ *slr1738* cells, unnoticed by previous workers {Li, 2004 #4673}, is consistent with the increased expression of various antioxidant genes (data not shown) such as the *sll1621* peroxiredoxin gene {Hosoya-Matsuda, 2005 #4730}. This phenotype is also consistent with the sequence homology between Slr1738 and the *B.subtilis* PerR (peroxide resistance regulator) {Kobayashi, 2004 #4674} {Li, 2004 #4673} the inactivation of which increases resistance to oxidative stress {Bsat, 1998 #4731}.

As expected, the *Synechocystis*  $\Delta$ *slr1738* mutant appeared to be less resistant to Cd than the WT strain (Figure 4C), indicating that Slr1738 mediates some of the Cd-elicited regulations. Consequently, we used DNA microarrays to identify the genes whose transcript abundance in Cd-treated cells differed at least twofold between the  $\Delta$ *slr1738* mutant and the WT strain. Very interestingly, the Cd-directed expression of the genes coding for ribosomal and photosynthesis proteins (PSII large subunits, PBS, pigments synthesis, ATPases, cytochrome b6/f complex) was higher in  $\Delta$ *slr1738* cells than in WT cells (Table 2A,B,C,D,E,F). By contrast, the Cd-controlled expression of the *nblA* genes operating in phycobilisome (PBS) degradation was lower in the  $\Delta$ *slr1738* mutant than in the WT strain (Table 2B). Collectively, these results suggest that Slr1738 plays a central role in the two complementary regulation processes underlying the Cd-elicited decline of the PS machinery:



(i) downregulation of proteins synthesis and (ii) upregulation of proteins turnover. This interpretation was validated through absorption-spectroscopy analyses of the cellular content of PS proteins. As expected, the Cd-elicited decline of pigmented proteins was truly lower in the  $\Delta$ slr1738 mutant than in the WT strain (compare Figures 1E and 1A).

Slr1738 was also found (Tables 2C and 2D) to contribute to the Cd-mediated upregulation of the *suf* genes involved in Fe-S cluster assembly and repair, and the *ars* genes operating in tolerance to arsenic and cadmium (see Figure 3). By contrast, Slr1738 appeared not to participate to the Cd-mediated regulation of carbon metabolism (Table 2E), indicating that other Cd response regulator(s) remain to be identified.

## DISCUSSION

Photosynthetic organisms are increasingly challenged by heavy metals that are persistent in the environment since they cannot be degraded. In the future view of engineering photosynthetic organisms with enhanced stress tolerance, and considering that the disturbance metal homeostasis can generate oxidative stress {Stohs, 1995 #3880}, we have investigated the global responses of the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to cadmium (Cd), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and noxious concentrations of otherwise crucial metals {Rosenzweig, 2002 #4692} iron (Fe) and zinc (Zn). Besides stress-specific responsive genes, others were found to be commonly regulated by Cd, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe- and Zn-stresses (Table 2), suggesting that reactive oxygen species might act as signaling molecules to mediate general stress responses as suggested {Toledano, 2004 #4742}.

The biological relevance of the global stress responses presented in Table 2 was attested by the following evidences. First, most genes operating in Fe- or Zn-acquisition were found to be regulated by the availability of their cognate metal. Second, there was an excellent correlation between gene co-expression and operon organization. Third, well-known phenomenons of opposite regulations were observed, and sometimes extended, in the present study. Among many other cases, this was true for (i) flavodoxin (*isiB*, induced by Fe starvation, Zn excess, Cd, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and ferredoxin I (*fedI*, repressed by Fe starvation, Zn excess, Cd, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); (ii) plastocyanin (*petE*, induced by Fe excess and Cd) and cytochrome c6 (*petJ*, repressed by Fe excess and Cd); and (iii) glutamine synthase (*glnA* induced by Fe starvation, and repressed by Fe excess, Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and GlnA inhibiting factor (*gifAB* genes repressed by Fe starvation, and induced by Fe excess, Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Fourth, in most cases the dispersed genes encoding the various subunits of the same protein complex were found to be co-regulated (for instance

see: ATPase, PSII or PSI genes). Fifth, the arsenate reductase gene *arsC*, which appeared to be upregulated by Cd (Table 2C), was found to contribute to Cd tolerance (Figure 3). Thus, the ArsC enzyme has a great biotechnological potential, in contributing to the tolerance to two widespread persistent pollutants: arsenic and cadmium.

The occurrence of large clusters of co-regulated genes, such as those encoding ribosome, ATPase or Fe uptake proteins (Tables 2A, 2B and 2C), suggests a mechanism of global control of gene expression involving chromosomal structure, similarly to eukaryotic chromatin remodeling. Interestingly, the HU and Dps nucleoproteins of *Synechocystis* that might contribute to such structure-dependent global regulation {Dorman, 2003 #4676} appeared to be regulated by Cd, positively (HU, *sll1712*) or negatively (Dps, *slr1894*), respectively (see supplemental Table 2).

A very important target of Cd toxicity was the photosynthesis (PS) machinery. First, Cd upregulated several light-stress inducible genes (Table 2A) and truly decreased the cell tolerance to light (Figure 2C). Then, Cd downregulated most PS genes and it upregulated protein degradation genes (Tables 2 A and 2B), thereby decreasing the abundance of the PS apparatus (Figure 1A). Simultaneously, Cd downregulated a variety of genes operating in acquisition and metabolism of carbone (C) and nitrogen (N). Similarly to Cd, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upregulated numerous genes operating in light tolerance, protein maturation and turn over (Table 2A), and it downregulated a wealth of genes involved in protein production, C and N metabolisms (Table 2E and F) and PS (except PSII genes, Table 2B). In addition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> downregulated respiratory genes (cytochrome oxidase and NADH deshydrogenase; Table 2B) that did not respond to Cd.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> also upregulated numerous anti-oxidant genes (Table 2D) as expected, as well as Fe uptake genes (Table 2C) and the *suf* genes (Table 2D) involved in iron-sulfur cluster biogenesis {Wang, 2004 #4701}. By analogy with what occurs in oxidative-stressed *E.coli* cells {Benov, 1998 #4727} {Zheng, 2001 #4603} {Djaman, 2004 #4729}, these findings suggest that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenged *Synechocystis* cells accelerate iron uptake to provide Fe atoms for the repair of damaged Fe-S clusters. Similarly, Cd upregulated genes encoding anti-oxydant (Table 2D), Suf (Table 2D) and Fe-uptake (Table 2C) proteins, suggesting that it disturbed Fe-S centers and probably other Fe-containing metalloproteins. Since only half of the Fe uptake genes were upregulated by Cd, we believe that extra Fe atoms for repairing Fe-containing metalloenzymes are also provided by recycling those liberated upon the PS breakage (Figure 1A). By contrast, in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells that preserved their PS machinery (Figure 1D), we assume that extra Fe atoms required for Fe-S centers repair are mostly

supplied from the growth medium, thank to the upregulation of all Fe acquisition genes (Table 2C). From these interpretations one can predict that Fe availability affects Cd tolerance. Indeed, we found that increasing the Fe content of the medium at the onset of the stresses decreases the toxicity of Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figures 2A and 2B), as well as the Cd-elicited decline of the PS machinery (Figure 1C).

Very interestingly, many of the key genes involved in assimilation and metabolism of C, N and S that were downregulated by Cd and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are coding for ATP-consuming enzymes (Tables 2A, 2B, 2E and 2F). These findings indicate that the stressed cells elicit a global ATP-sparing response to compensate for the decreased production of ATP caused by the decline of the PS apparatus (Cd and, to a lesser extent, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and (presumably) respiratory activity (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In addition, the Cd- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated downregulation of normally abundant {Mrazek, 2001 #4705} ribosomal proteins (Table 2A) is likely aimed at sparing nutrient assimilates. In turn, the global downregulation of protein synthesis enables the stressed cell to limit the production of aberrant enzymes containing Cd atoms incorporated in place of their natural metal cofactor.

Many of the present data support the notion of metal selectivity, which we will thoroughly investigate in the future. For instance, Zn, but not Fe, was able to mimick the Cd-mediated regulation that led to the PS waning (Tables 2A and 2B, and Figures 1A, 1B and 1C). By contrast, Fe, but not Zn, was able to mimick the Cd-mediated control of N acquisition and assimilation genes (Table 2F).

Based on the mutually confirmatory data presently reported, we view the responses to Cd as a “Yin Yang” integrated reprogramming of the cell metabolism. As the Yin process, most key genes operating in uptake and assimilation of inorganic nutrients (C, N and S) and protein production are turned down. These responses allow the sparing of energy (ATP) normally consumed by nutrient assimilation and subsequent metabolism, and likely limit the poisoning incorporation of Cd in metalloenzymes. As the compensatory Yang process, the PS breakdown that decreases ATP production, liberates nutrient assimilates that are recycled into the synthesis of Cd-tolerance enzymes, among which we found the ArsC arsenate reductase (Figure 3).

Finally, we showed that the Slr1738 regulator mediates several of the key regulations triggered by Cd, namely: (i) the upregulation of the *arsC* arsenate reductase gene (and operonic partners) truly operating in Cd tolerance (see above); and (ii) the downregulation of PS and ribosomes genes. That Slr1738 truly controls the PS decline elicited by the cells to resist the Cd stress, was established through the construction and analysis of the *slr1738*-null

mutant. Cells lacking Slr1738 were (i) unable to decline their PS machinery (Figure 1E) in response to Cd, and (ii) hyper sensitive to this toxic metal (Figure 4C). Thus, the slr1738-null mutant is a useful tool to investigate the selectivity of, and connection between, stresses triggered by heavy metal and oxidative agents.

## METHODS

### Bacterial Strains and Growth Conditions

*Synechocystis* PCC6803 was grown as described {Mazouni, 2003 #4621} at 30°C in BG11 medium enriched with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.78 mM, final concentration), under continuous white light of standard fluence (2,500 luxes, i.e. 31.25  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). When required kanamycine 50-300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  was added to the cultures.

The influence of noxious agents on the growth of liquid cultures was assayed as follows. Cells grown three times in liquid Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-containing BG11 medium up to mid log phase (OD<sub>580</sub> 0.5 units, i.e.  $2.5\times 10^7$  cells. $\text{ml}^{-1}$ ) were inoculated into the same fresh medium with or without CdSO<sub>4</sub> (3.5  $\mu\text{M}$ ) or paraquat (4.0  $\mu\text{M}$ ), and OD<sub>580</sub> were measured at time intervals. Each experiment was duplicated and yielded very small statistical deviations (often too small to be represented). The influence of various agents on the growth on solid media was assayed as follows. Four fold serial dilutions of above mentioned liquid cultures were spotted as 15  $\mu\text{L}$  dots onto BG-11 plates supplemented (or not) with the indicated concentration of the tested agents. Plates were then incubated for 4-5 days under standard conditions prior to scanning (HP scanjet 5400).

### Construction of Knock-Out Mutants of Slr0946 (Arsenate Reductase) or Slr1738 (PerR-Like Regulator)

Specific oligonucleotides were used for PCR amplification, from the *Synechocystis* genome (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>), of each studied gene along with its two 0.3 kb-long flanking DNA segments that provides homologous platforms for recombination mediating targeted gene replacement {Labarre, 1989 #1325}. slr0946- and slr1738-containing PCR products were independently cloned in the pGEMt plasmid (Pharmacia). slr0946 was

inactivated by replacing an internal 223 bp segment (starting from the 7<sup>th</sup> nucleotide downstream of its GTG start codon) with the *Stu* I restriction site, which was subsequently used to insert the *Hinc* II Km<sup>r</sup> cassette originating from the pUC4K plasmid (Pharmacia). For slr1738 inactivation, it is a 388 bp segment (beginning 6 nucleotides behind the ATG start codon) that was replaced by the *Sma* I site used to clone the same *Hinc* II Km<sup>r</sup> cassette. The resulting gene deletion cassettes slr0946::Km<sup>r</sup> and slr1738::Km<sup>r</sup> were sequenced (Big Dye kit, ABI Perking Elmer) prior to transformation to *Synechocystis* {Labarre, 1989 #1325}. PCR analyses of the resulting mutant strains showed that they had been properly inserted the antibiotic resistant cassette in their genome, thereby replacing the corresponding wild-type gene, in every chromosome copies. These null mutants grew healthy in standard conditions, demonstrating that Slr0946 and Slr1738 proteins are dispensable to the viability of *Synechocystis*.

### **Survival to Hydrogen Peroxide**

Exponentially growing cells were harvested at a density of  $2 \times 10^7$  cell ml<sup>-1</sup>, washed and resuspended at the same concentration in fresh BG11 medium. Then, 1 ml aliquots were incubated for 1 hr with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (at the indicated concentration) in standard conditions, washed twice with BG11, and plated on solid BG11 medium. Surviving colonies were counted after 5-7 days of incubation under standard conditions.

### **Photosynthetic Pigments Determination by Absorption Spectrometry**

Absorption spectra of whole cells grown on solid medium and resuspended in water were monitored with a DU640 spectrophotometer (Beckman), using samples that were adjusted for equal scattering at 800 nm. Cultures were done as for transcriptome analysis (see RNA isolation). The absorption maxima for chlorophyll a are 442 nm and 681 nm, while those of phycocyanin is 630 nm. Carotenoids absorb light between 350 and 540 nm

### **RNA Isolation**

300 ml of mid-log phase liquid cultures ( $2.5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>) grown in standard conditions were rapidly concentrated 40-fold by centrifugation and spotted as 20  $\mu$ L dots on BG11 plates

with or without various agents ( $\text{CdSO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$ ;  $(\text{NH}_4)\text{FeH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 17  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4$ , 776  $\mu\text{M}$ ; or  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3mM), as indicated in Table 2. Then the plates were incubated at 30°C under standard light (see above) for the indicated times (in min.)

For iron depletion, exponentially growing cells were washed in Fe-free  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -containing BG11 medium and grown for 48 hrs under standard conditions in liquid BG11 medium containing  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and either 1  $\mu\text{M}$  or 2  $\mu\text{M}$  of  $(\text{NH}_4)\text{FeH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , as indicated in Table 2. Then, cells were then washed and resuspended in Fe-free  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -containing BG11 medium, and grown for another 48 hrs period grown under standard conditions.

Following growth, all cell samples were rapidly harvested and disrupted. RNA were extracted {Domain, 2004 #4677} with the RNeasy kit from Qiagen (DNA microarrays kit), and treated with RNase-free DNase I (Roche). The RNA concentration and purity were determined by A260 and A280 measurement ( $\text{A260}/\text{A280} > 1.9$ ), as well as by migration on agarose gel to verify the absence of RNA degradation (absence of a smeary aspect of the rRNA bands).

### DNA Microarray Analysis

DNA microarrays (IntelliGene<sup>TM</sup> CyanoCHIP version 1.2 or 2.0, Takara), covering 2,891 (CyanoCHIP 1.2) or 2,954 (CyanoCHIP 2.0) of the 3,168 ORFs of *Synechocystis* {Kaneke, 1996 #3273} were purchased from Cambrex Bio Science.

Dye labelling of cDNA, hybridizations, signal quantification and image analysis were performed as previously described {Domain, 2004 #4677}. For duplicate experiments, the Cy3 and Cy5 dyes were swapped for the experimental and reference samples. Hybridized arrays were immediately scanned using a GenePix<sup>TM</sup> 4000B scanner (Axon Instruments). Image analysis was performed using GenePix<sup>TM</sup> Pro 4.0, and single spots or areas of the array with obvious blemishes, deformations or dusts were excluded (supplemental Table 1). Spots were considered when they showed fluorescence values greater than local background fluorescence plus 2 standard deviations. Then, signal intensity was determined by subtracting local background of each spot. The signals were analyzed with GeneSpring (Silicon genetics), using the global normalisation LOWESS method (supplemental Table 2). Normalisation values were validated using both internal (positive: *Synechocystis* DNA; negative: Salmon sperm DNA) and external controls (human TFR mRNA). To identify differentially expressed genes, the mean of the normalized ratio of Cy5/Cy3 intensity was calculated for each spot of

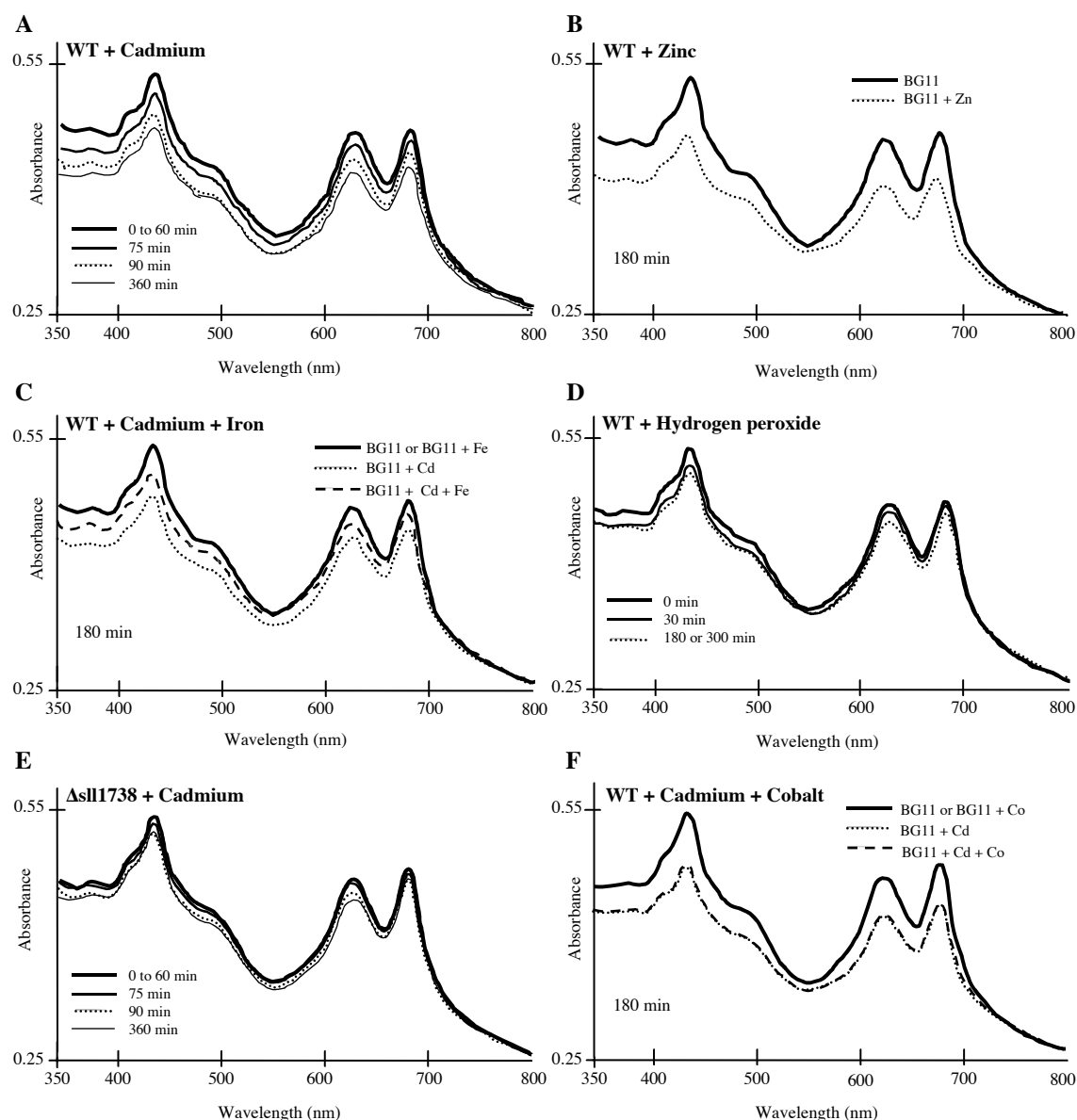
the replicated dye-swap. The results of the analysis were carefully examined to exclude the dye effect between the 2 Cy-swapped arrays. As control versus control hybridization experiment showed 100% data points with a ratio of signal fluorescence not exceeding 1.6, we felt confident to regard as regulated any particular gene the expression level of which was changed at least 1.9 fold in response to the tested treatment. Clustering analysis were carried out with GeneSpring; similarity was measured by pearson correlation, the separation ratio was 1.0, and the minimum distance was  $1 \times 10^{-3}$ .

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the scientific Programme “Toxicologie Nucléaire Environnementale (France)”.

L.H and B.M were both recipients of PhD fellowships from the CEA (France). M.F. was recipient of MENESR PhD fellowship. We thank J-J. Leguay , M. Toledano and M-T Menager for encouragements and support.

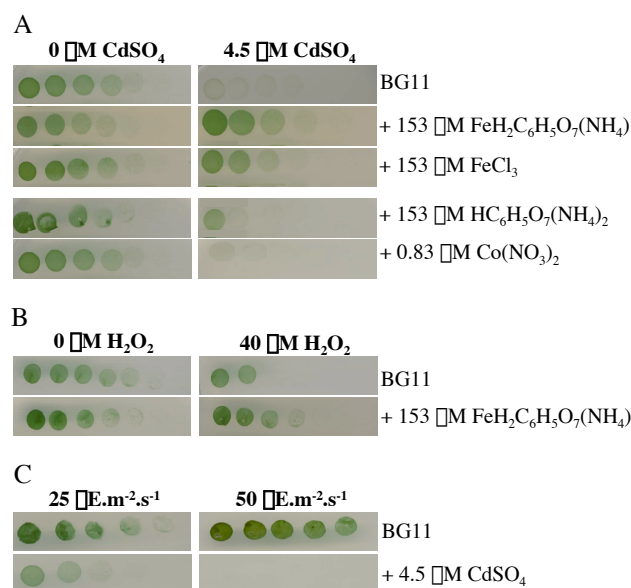
## FIGURES



**Figure 1.** Influence of metals and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on photosynthetic pigment content.

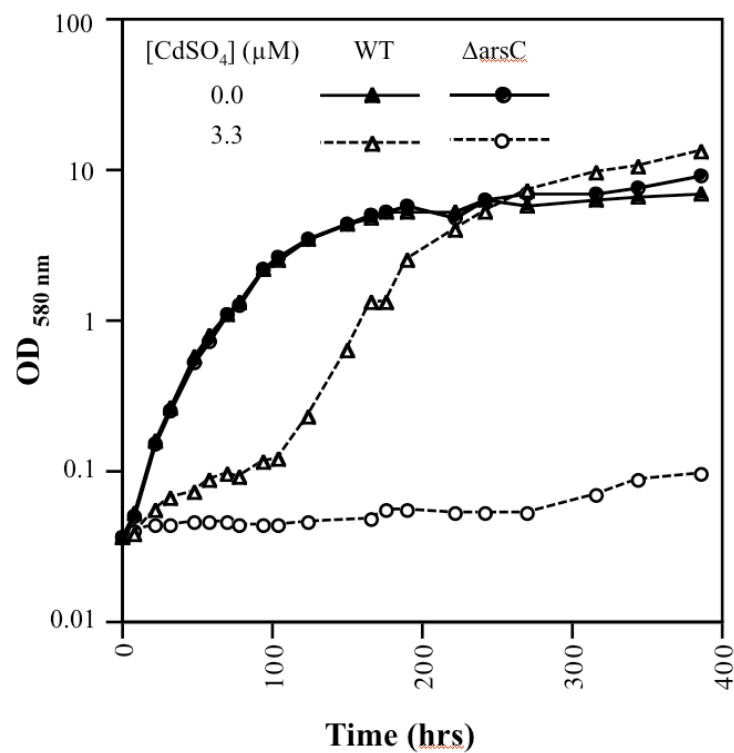
Absorption spectra of whole cells of the wild type (WT) or *slr1738* null mutant ( $\Delta$ *slr1738*), incubated for the indicated durations on solid media with or without the following agents: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM); CdSO<sub>4</sub> (50  $\mu$ M); Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (350  $\mu$ M); (NH<sub>4</sub>)FeH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (350  $\mu$ M); ZnSO<sub>4</sub> (350  $\mu$ M). For the sake of clarity the spectra (normalized to light scattering at 800 nm) were displayed in panels A to F.



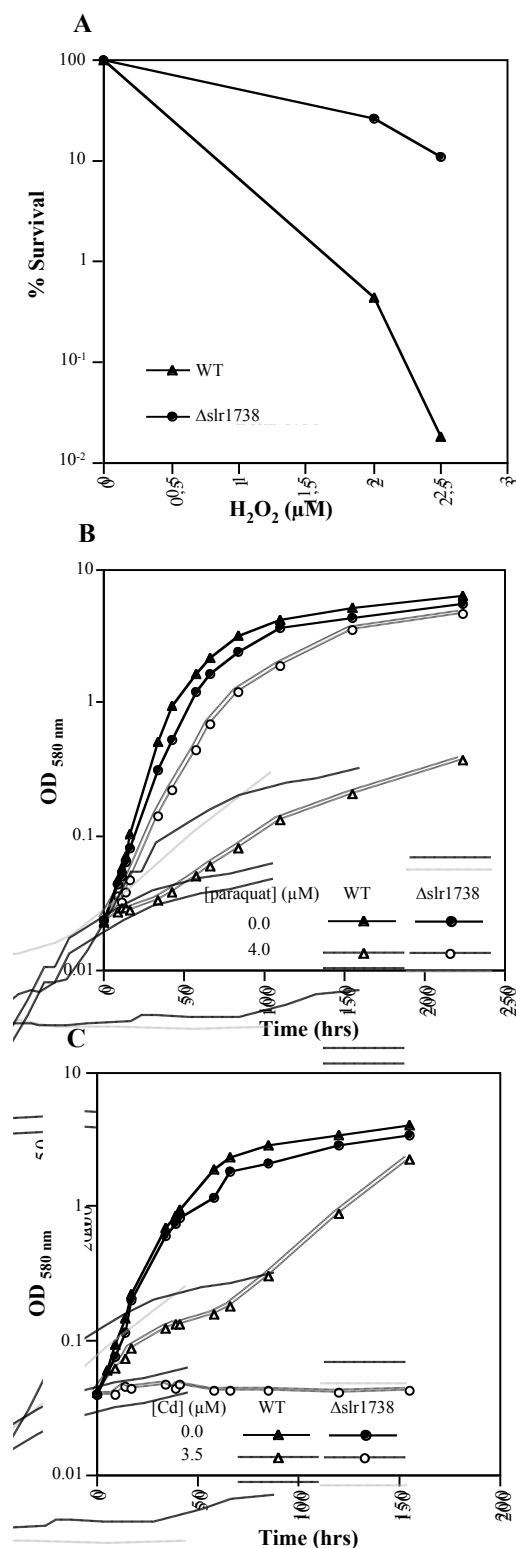


**Figure 2.** Effect of metal, hydrogen peroxide and light fluence on cellular growth.

Four fold serial dilutions of mid log phase liquid culture growing in standard concentration were spotted as 15  $\mu\text{L}$  dots onto standard (BG11) plates with or without the indicated concentration of the tested agents. Plates were incubated for 4-5 days under standard conditions prior to scanning. Panel A: Influence of iron ( $(\text{NH}_4)\text{FeH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  or  $\text{FeCl}_3$ ), cobalt ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ) and citrate ( $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) on the toxicity of cadmium ( $\text{CdSO}_4$ ). Panel B: Influence of iron ( $(\text{NH}_4)\text{FeH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) on the toxicity of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Panel C: Influence of the light fluence on the toxicity of cadmium ( $\text{CdSO}_4$ ).



**Figure 3.** Influence of cadmium on the growth of the wild type strain and  $\Delta arsC$  mutant. Growth of the wild type (WT, triangles) and  $\Delta arsC$  mutant (circles) in liquid Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-containing BG11 medium with (dashed lines) or without (solid lines) CdSO<sub>4</sub> (3.3  $\mu$ M).



**Figure 4.** Influence of the *slr1738* gene on the tolerance to cadmium and oxydative stress.

Panel A: Survival to  $H_2O_2$  of the wild type (WT, triangles) and  $\Delta slr1738$  mutant (circles) cells. Panels B and C: Growth of the wild type (WT, triangles) and  $\Delta slr1738$  mutant (circles) in liquid  $Na_2CO_3$ -containing BG11 medium with (dashed lines) or without (solid lines) paraquat (4.0  $\mu M$ , panel B) or  $CdSO_4$  (3.5  $\mu M$ , panel C).

Treatment	Cadmium										Hydrogen peroxyde					Fe depletion		Fe excess		Zn excess	
[C]	50 uM										3 mM					2-0	1-0	16mM	776 uM		
Time (min)	15	30	60	75	90	180	300	300b	360	960	15	30	180	300	420	2880	2880	240	360	30	240
% survival	100	98	90	88	85	70	57	59	43	<10	100	98	64	45	19	55	43	80	15	99	70
Induced genes	18	65	32	39	225	226	215	358	215	37	339	313	124	30	34	73	116	16	22	23	184
Repressed genes	2	13	13	9	206	252	280	385	270	18	381	366	52	6	26	65	84	72	87	8	131

Table 1: Influence of Stress on the Viability and Global Transcription Profile.

Wild type cells were challenged for the indicated durations in liquid medium (Fe starvation) or solid medium (all other stresses) prior to survival and transcriptome analyses, performed as described in Methods. In the case of the Fe starvation stress, the switch in Fe concentration is indicated as 1-0 (standing for 1 then 0  $\mu$ M) or 2-0 (standing for 2 then 0  $\mu$ M). The time point 300 min of the kinetic of Cd responses was repeated twice (columns 300' and 300b') with the two different versions of the Cyanochip DNA microarrays (Methods), leading to very reproducible results (Table 2). Genes were considered differentially regulated whenever their level of expression was changed at least 1.9 fold.

Strain and treatment	WT : Cd WT : SC										1738:Cd WT : Cd	WT : H2O2 WT : SC					WT : Fe- WT : SC		WT : Fe+ WT : SC		WT : Zn+ WT : SC		Gene name		
Time or C	15'	30'	60'	75'	90'	180'	300'	300b'	360'	960'	180'	15'	30'	180'	300'	420'	1-0	2-0	240'	360'	30'	240'			
A: PROTEIN SYNTHESIS, FOLDING, AND TURNOVER																									
Chaperones																									
slr0430	0,56	1,81	1,72		2,17	6,54	4,76	2,92	4,27	1,73	1,10		1,37	0,41	1,56	1,22	1,47	0,57	0,38	2,78	2,40	1,06	1,81	htpG	
slr1514	0,55	3,04	3,23		3,41	13,23	14,51	13,36	13,27	10,29	3,49	0,42	4,38	9,02	16,68	9,46	15,98	0,67	0,07	2,45	2,94	1,83	3,75	hspA	
slr0170	0,60	2,09	1,49		2,00	4,89	3,20	2,00	2,33	2,60	1,76		2,13	1,10	4,33	1,76	2,33	0,86	0,53	1,60		1,11	3,05	dnaK	
slr0416	0,68	2,17	1,79		1,97	4,01	3,87	3,26	3,88	2,45	1,00		0,77	0,46	1,01	1,73	1,34	0,45	0,68	1,40	1,66	0,71	2,70	groEL2	
slr0897 <sup>a</sup>	1,07	1,34	1,14	1,19		1,97	2,54	2,28	2,57	2,47	1,08		0,46	1,53		1,41	1,24	0,88	0,96	1,01	1,34	1,10	2,37	dnaJ	
sls1707 <sup>a</sup>	0,87	1,26	1,16	0,98		1,82	2,47	2,20	2,66	2,34	1,05		0,44	1,51	2,02	1,33	1,47	0,77	1,10	1,08	1,50	0,99	2,42	ho	
slr1933		1,35	1,14	1,12	1,13			1,21	1,85	1,30	1,15		0,55	0,35	1,14	0,88	1,30	0,85	1,18	1,18	1,14	0,75	1,41	dnaJ	
slr1666	1,12	1,18	1,31	1,54		2,09	2,08		1,73	1,82	1,37	1,46	0,72	0,79	0,92	0,74	0,81	1,04	1,21	0,88	0,92	1,42	1,84	dnaJ-like	
slr0093	1,05	2,02	1,44	1,51		2,69	3,91	2,50	3,87	2,96	1,55		1,82	9,09	8,76	2,94	6,58	0,78	0,54	1,09	1,14	1,13	1,17	dnaJ	
slr2075	0,74	1,30	1,68	1,77		3,37	2,78	2,21	2,63	2,05	1,08		1,06	0,42	1,07	1,28	1,89	0,31	0,41	1,37	1,37		1,84	groES	
slr2076	0,60	1,69	1,65	1,79		3,65	3,02	2,33	2,47	2,23	1,41		1,18	0,27	1,17	1,04	1,71	0,39	0,51	1,65	0,97	1,01	2,14	groEL1	
slr0057	1,03	0,95	1,02	1,02	1,13	1,24	1,16	1,35	1,51	0,98			0,42	0,46	1,10	1,10	0,86	0,62	0,82	1,36	1,60	0,66	1,18	grpE	
Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides																									
slr1204	1,13	26,67	15,81	12,62	22,72	4,80	7,04	9,18	7,83	2,27			2,99	2,04	1,38	1,72	7,09		1,06	0,50	0,53	2,83	1,91	htrA	
slr1641	0,45	1,95	1,12	0,96		4,68	6,89	3,82	6,03	4,25	1,20	0,49	2,86	0,62	11,50	3,34	4,55	0,80	0,59	1,25	1,28	0,76	9,55	clpB2	
slr1751	1,68	2,14	1,90		1,75	4,23	3,67	3,65	4,75	4,77	2,02		1,49	1,71	1,86	0,61	1,08	0,73	0,67	1,01	0,70	0,79	0,59	ctpC	
slr0020	0,76	1,42	1,35	1,57		2,96	2,34	2,58	NS	2,33	1,13	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	clpB	
slr0257	1,54	1,34	1,46	1,51		2,81	2,11	3,08	2,47	2,29	1,31		0,61	1,28	1,29	0,97	0,91	0,77	0,76	1,08	1,08	0,80	1,31	ctpB	
slr1427	1,35	1,65	1,50	1,80		3,11	2,69	2,30	3,26	2,26	1,60		1,06	0,66	1,21	0,76	1,11	0,86	1,11	0,71	0,73	0,85	1,88	hhoB	
slr1679	1,30	1,82	1,76	1,73		3,35	3,64	2,52	3,72	1,84	1,85		0,42	0,31	0,88	0,59	0,80	0,63	1,11	0,97	0,71	0,94	1,70	hhoA	
slr0165	1,08	1,11	1,25	1,55	1,83	1,32	1,05	1,03	0,79	0,96			0,49	0,52	0,90	0,96	0,82	0,59	0,84	1,59	1,39	0,98	1,03	clpP3	
slr0542	1,20	1,00	1,23	1,15	1,40	1,40	1,38	1,54	1,35	0,95			0,51	0,49	1,15	1,39	0,77	0,70	0,70	1,71	1,52	0,75	1,11	clpP1	
slr0535	1,03	0,94	0,93	0,92	0,96	0,96	0,98	1,55	0,90	0,90			0,35	1,35	1,21	0,83	1,13	0,91	0,89	1,18	0,99	1,23	1,78	clpX	
slr1343	0,86	1,12	1,07	1,11	0,93	0,90	0,90	0,75	0,94	1,02			0,31	0,90	0,99	0,90	0,91	1,02	1,22	0,96	0,94	0,76	1,63	pepN	
slr0008	1,32	1,31	0,92	1,02	1,16	1,42	1,07	1,37	1,75	0,97			1,07	2,72	2,61	1,02	1,44	0,48	0,65	1,05	0,80	1,16	1,96	ctpA	
slr1703	1,03	1,03	0,96	0,86	1,04	1,07	0,97	1,60	0,83	0,99			0,54	0,55	1,22	0,88	1,13	0,97	0,99	0,97	0,99	0,93	2,58	sppA	
Protein modification and translation factors																									
slr0885 <sup>b</sup>		1,20	1,35	1,52		2,99	2,85	3,04		2,34	1,37		7,39		3,02	0,80	2,30	1,14	0,62	0,69	0,96		0,92	ho	
slr0869 <sup>b</sup>		1,16	1,18	1,37		1,97	2,01	2,69	2,72	1,91	1,26		2,64	1,78	1,44	0,69	0,91	0,73	1,30	0,63	0,90	0,82		aat	
slr0868 <sup>b</sup>	0,99	1,20	1,33	1,33		1,77	1,54	1,31	1,99	1,19	1,06		0,91	0,54	1,46	0,89	1,27	1,05	1,02	1,06	0,88	1,11	1,73	lipA	
slr0867 <sup>b</sup>	1,06	1,20	1,47	1,41		2,14	1,77	1,84	1,71	1,16	1,26		0,72	0,82	1,18	0,80	0,94	0,97	1,12	0,96	0,84	1,57	1,16	ho	
slr0974	0,98	1,09	1,22	0,72		1,67	2,17	1,63	2,02	2,96	1,09		0,35	1,23	1,57	1,08	1,40	1,02	1,06	1,11	1,42	0,56	0,85	infC	
slr0145	0,91	0,79	0,89	0,79		0,48	0,42	0,47	0,46	0,45	0,71		0,52	0,51	0,65	0,87	0,70	1,08	1,25	1,40	1,35	0,54	0,52	rrf	
slr0434	1,12	0,86	0,89	0,78		0,52	0,51	0,46	0,48	0,42	0,79	2,11	0,51	0,36	0,53	0,80	1,00	0,97	1,38	1,39	1,32	1,04	0,56	efp	
slr0546	0,93	0,94	0,86	0,87	0,73	0,48	0,53	0,63	0,66	0,88			0,89	0,73	0,71	1,04	1,34	1,28	0,80	0,99	1,12	0,61	0,51	yciH	
slr1251	0,80	0,92	0,85	0,64	0,37	0,45	0,55	0,54	0,82	0,89			1,10	0,28	0,69	1,14	1,01	0,78	1,51	1,13	1,44	1,18	0,65	ppiB	
slr0830	0,87	0,93	1,13	1,01	0,97	0,80	0,92		1,44	1,17			8,06	2,16		0,91	0,93	1,82	0,52	0,95	1,31	0,92		fus	
slr1098 <sup>c</sup>	1,06	0,88	1,17	1,15	0,90	0,54	0,53		0,38	0,80			0,86	0,60	1,16	0,85	1,43	0,82	1,01	1,86	0,91	1,02	2,11	fus	
slr1099 <sup>c</sup>	1,01	0,96	1,07	0,98	0,91	0,49	0,46	0,63	0,42	1,09			0,62	0,50	0,92	0,95	1,11	0,68	1,08	1,92		0,94	1,77	tufA	
slr1105	1,29	1,44	1,08	0,95	0,85	1,14	1,42	1,26	0,97	0,92			1,20	3,03	1,46	1,03	1,18	1,16	1,10	1,59	1,25	1,04	2,20	bipA like	
slr2001	1,20	1,04	1,39	1,09	1,01	1,18	1,45	1,40	1,26	1,17			0,49	0,34	1,01	1,09	0,99	0,90	1,70	1,26	0,98	1,33	1,08	pepA	
slr0555		1,62	1,25	0,75	0,86	1,18	1,73	1,67	0,95				0,43	0,48	0,66	0,95	0,85	0,57	0,91	1,18	1,09	0,99	1,18	map	
Ribosomal proteins: synthesis and modification																									
slr1096	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,66	NS	NS			0,75	0,36	0,81	1,35	0,98	0,73	1,15	1,72		1,03	1,13	rps12	
slr1097	0,85	0,96	0,99	0,77	0,66	0,57	0,63	0,58	0,76	0,94			1,06	0,52	0,97	1,47	1,30	0,82	1,00	1,86	1,63	1,20	1,15	rps7	
slr1101	1,10	0,92	1,01	0,90	0,72	0,38	0,34	0,44	0,37	0,96		2,10	0,33	0,19	0,85	1,65	1,07	0,67	1,05	1,53	1,52	0,92	0,75	rps10	
slr1244	0,89	1,07	0,96	0,71	0,56	0,48	0,49	0,52	0,34	0,85			2,06	0,61	0,41	0,76	1,06	0,94	0,59	0,66	1,18	1,20	0,81	0,58	rpl9
slr1260	0,85	0,92	1,07	0,85	0,62	0,47	0,48		0,56	0,61	1,00		2,19	0,91	0,25	1,11	1,40	1,43		1,22	1,32	1,57	0,81	0,57	rps2
slr1740	0,82	1,05	1,10	0,94	0,91	0,73	0,97	0,76	1,17	1,06			0,80	0,40	0,99	1,19	1,17	0,76	0,84	1,11	1,06	1,02	0,87	rpl19	
slr1744 <sup>d</sup>	0,97	0,87	1,06	0,79	0,71	0,48	0,57	0,46	0,72	0,79			1,38	0,62	1,36	1,56	1,78	0,85	0,82	1,18	1,41	0,75	0,59	rpl1	
slr1745 <sup>d</sup>	1,05	0,81	1,12	0,97	1,53	0,56	0,47	0,51	0,63	0,78		3,24	0,66	0,66	0,68	1,62	1,00								

sl1821 <sup>f</sup>	1,02	0,84	1,08	0,78	0,76	0,50	0,49	0,45	0,38	0,85		0,49	0,42	0,77	1,03	0,95	0,76	1,13	1,38	1,35	1,03	1,18	rpl13	
sl1822 <sup>f</sup>	1,15	0,89	1,12	0,85	0,70	0,53	0,53	0,69	0,46	0,86		0,58	0,28	0,90	0,96	1,05	0,69	0,80	1,58	1,47	0,86	1,12	rps9	
ssl3445 <sup>f</sup>	1,17	0,89	0,91	0,66		0,49	0,42	0,45	0,41	0,33	0,95		0,51	0,62	0,69	1,39	0,83	0,56	0,85	1,22	1,27	0,73	0,83	rpl31
sl1824 <sup>f</sup>	0,99	0,86	1,02	0,84	0,60	0,48	0,48	0,49	0,32	0,92		0,85	0,25	0,88	0,94	1,16	0,74	0,90		1,26	1,03	1,15	rpl25	
smr001 <sup>g</sup>		1,05	0,99	0,68	0,42	0,57	0,65	0,60	0,69	0,89		1,59	1,37	0,87	1,70	0,98	0,81	0,67	1,27	1,38	0,85	0,69	rpl34	
slr1469 <sup>g</sup>	0,99	0,85	0,89	0,76	0,46	0,46	0,51	0,56	0,59	0,98		1,20	0,78	0,92	1,03	1,29	0,65	0,69	1,50	1,20	0,82	0,74	rnpA	
slr1470 <sup>g</sup>	0,92	0,93	1,10	1,06	0,87	0,64	0,53	0,60	0,48	0,81		1,39	0,90	1,19	0,91	1,29	0,86	0,66	1,61	1,14	0,88	0,76	ho	
sl10767 <sup>h</sup>	0,83	0,85	1,29	0,98	0,70	0,45	0,61	0,56	0,56	0,91		0,65	0,39	0,83	1,31	0,94	0,93	1,06	1,41	1,08	0,72	0,89	rpl20	
ssl1426 <sup>h</sup>	0,83	0,84	1,14	0,81	0,48	0,40	0,47	0,53	0,45	1,24	2,60	1,05	0,39	0,91	1,19	1,13	0,77	0,92	1,31	1,18	0,95	0,58	rpl35	
ssr0482	0,75	0,90	0,84	0,66	0,43	0,56	0,80	0,60	1,11	0,93		0,86	0,63	0,77	1,16	0,88	1,40	1,91	0,72	0,90	0,94	0,94	rps16	
ssr1398	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,35	NS	NS	2,54	0,68	0,35	0,71	1,18	0,71	0,67	0,86	1,04	1,28	0,84	0,45	0,58	rpl33
ssr1399	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,30	NS	NS		1,20	0,52	0,79	1,55	0,80	0,74	0,63	1,11	1,33	0,76	0,40	0,76	rps18
ssr1604	0,92	0,96	0,97	0,85	0,48	0,52	0,65	0,74	0,68	0,91		0,95	0,55	1,06	1,04	1,47	1,11	0,84	0,89	1,09	0,67	0,64	rpl28	
ssr1736	0,94	0,91	0,97	0,72	0,36	0,45	0,48	0,50	0,53	0,83	2,09	0,86	0,43	0,64	1,20	1,15	0,74	1,14	0,93	1,25	0,58	0,74	rpl32	
ssr2799	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,49	NS	NS		1,79	1,55	0,93	1,03	0,46	1,04	1,38	0,87		1,04	0,58	0,74	rpl27
sl1909	1,12	0,96	0,76	0,80		0,66	0,77	0,75	0,83	0,97		0,43	0,45	0,65	1,13	0,76	1,01	1,04	1,31	1,66	0,77	0,95	prmA like	
slr1356	1,14	0,99	0,91	0,79	0,66	0,62	0,77	0,90	1,01	0,90		0,47	0,48	0,68	1,17	1,03	1,27	1,25	1,26	1,10	0,89	1,57	rps1a	
slr0754	0,76	1,42	1,30	1,78	3,56	3,20	2,93	2,03	3,28	1,72		0,80	0,86	1,14	1,44	0,69	0,61	0,54	1,26	1,64	0,68	0,99	rpfA	
slr0852 <sup>i</sup>	0,85	2,42	1,30	1,28	4,16	4,22	3,70	3,86	4,28	1,57		0,99	14,99	3,47	1,73	2,04	0,94	0,50	1,65	2,05	0,95	2,55	ho	
slr0853 <sup>i</sup>	0,89	1,95	0,96	1,15	2,73	3,84	3,59	5,93	3,92	1,36		0,87	4,83	5,16	2,07	2,61	0,95	0,56	1,03	1,87	0,99	3,56	rmlI	

Strain and treatment	WT : Cd WT : SC										1738:Cd WT : Cd	WT : H2O2 WT : SC					WT : Fe- WT : SC		WT : Fe+ WT : SC		WT : Zn+ WT : SC		Gene name	
Time or C	15'	30'	60'	75'	90'	180'	300'	300b'	360'	960'	180'	15'	30'	180'	300'	420'	1-0	2-0	240'	360'	30'	240'		
B: PHOTOSYNTHESIS AND RESPIRATION																								
Photosystem I																								
ssl0563	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,22	NS	NS		2,88	1,70	0,47	1,07	0,45	1,84	0,85	0,83	0,64	1,18	0,33	psaC	
sl10226	1,34	0,95	0,87	0,87	0,66	0,59	0,71	0,71	0,66	0,80		0,49	0,51	0,50	0,79	0,80	0,66	1,10	1,52	1,38	0,79	0,72	ycf4	
sl10634	0,77	1,02	0,83	0,68	0,55	0,70	0,75	0,80	0,78	0,91	2,19	0,76	0,46	0,74	0,95	1,08	0,81	0,80	1,17	1,12	0,97	0,74	btpA	
sl10819 <sup>a</sup>	0,60	0,65	0,74	0,80	0,49	0,37	0,30	0,26	0,27	1,08		2,85	0,86	0,78	0,86	0,87	2,46	1,38	0,67	0,82	1,12	0,49	psaF	
sm1000 <sup>a</sup>	1,03	0,72	0,76	0,66	0,34	0,45	0,38	0,19	0,32	0,98		6,81	2,29	0,43	0,85	0,43	2,54	1,39	0,50	0,47	1,42	0,21	psaJ	
slr0737	0,71	0,66	0,78	0,76	0,45	0,22	0,13	0,12	0,10	0,61	3,37	1,93		0,61	0,83	0,49	2,61	1,20	1,01	0,63	0,89	0,27	psaD	
smr000 <sup>b</sup>		0,68	0,62	0,67	0,36	0,26	0,18	0,17	0,12	0,70			2,09	0,42	0,97	0,36	1,55	0,86	0,62	0,57	1,16	0,18	psaI	
slr1655 <sup>b</sup>	1,03	0,61	0,68	0,80	0,64	0,49	0,28	0,27	0,24	0,77		1,15	0,70	0,72	0,72	0,65	1,19	0,93	0,93	0,90	1,25	1,01	psaL	
smr0005	0,94	0,88	0,77	0,62	0,42	0,48	0,34	0,48	0,34	0,71		2,96	2,82	0,59	0,98	0,52		0,67	0,59	0,71	1,85	1,55	psaM	
ssr0390	0,96	0,77	0,62	0,72	0,47	0,57	0,42	0,13	0,36	0,74		0,98	0,73	0,38	0,89	0,46	1,66	1,16	0,84	0,64	0,88	0,36	psaK1	
sl10629	0,88	0,94	0,97	0,82	0,88	0,55	0,56	0,42	0,52	1,04			0,82	0,68	0,85	0,76	1,09	1,04	0,73	0,94	0,85	0,74	psaK2	
slr1834 <sup>c</sup>	0,93	0,70	0,62	0,74	0,59	0,32	0,19		0,16	0,71		0,95	0,78	1,25	0,81	1,29	1,06	1,35	1,02	0,91	1,02		0,74	psaA
slr1835 <sup>c</sup>	1,53	0,89	0,64	0,71	0,43	0,42	0,26	0,63	0,20	0,71		1,36	1,57	0,70	1,06	0,75	0,83	1,20	0,80	0,98	0,71	1,10	0,74	psaB
ssr2831	0,77	0,86	0,73	0,66	0,29	0,20	0,17	0,39	0,11	0,60		1,22	0,69	0,71	0,86	1,22	1,41	1,36	1,05	0,79	0,76	0,83	0,74	psaE
slr0171	0,91	1,10	0,90	0,79	0,47	0,43	0,48	0,58	0,51	0,83		0,92	0,84	0,66	1,07	1,72	0,77	1,16	1,31	1,06	0,83	0,40	0,74	ycf37
slr2033	0,72	0,95	0,86	0,89	0,57	0,51	0,51	0,42	0,44	0,72		1,38	1,66	0,57	1,16	0,59	0,62	0,82	1,16	1,15	0,93		0,74	rubA
ssl1417	0,87	0,90	1,03	1,14	1,36	1,85	1,89	1,73	1,61	1,30		0,38	0,23	0,69	1,33	0,57	1,09	1,27	0,99	1,43	1,31	1,61	0,74	ycf33
Photosystem II																								
slr2048	0,66	1,765	1,41	0,89	0,35	0,94	1,94	1,95	1,21	1,75		0,37	0,65	0,61	0,79	0,77	0,73	1,51	1,68	1,22	2,74	1,34	0,74	pratA
slr1751	1,68	2,14	1,90	1,75	4,23	3,67	3,65	4,75	4,77	2,02		1,49	1,71	1,86	0,61	1,08	0,73	0,67	1,01	0,70	0,79	0,59	0,74	ctpC
slr0257	1,54	1,34	1,46	1,51	2,81	2,11	3,08	2,47	2,29	1,31		0,61	1,28	1,29	0,97	0,91	0,77	0,76	1,08	1,08	0,80	1,31	0,74	ctpB
slr0008	1,32	1,31	0,92	1,02	1,16	1,42	1,07	1,37	1,75	0,97		1,07	2,72	2,61	1,02	1,44	0,48	0,65	1,05	0,80	1,16	1,96	0,74	ctpA
sl10247 <sup>d</sup>	1,04	1,08	1,19	1,19	1,56	1,87	3,85	15,80	5,79	0,44		28,47	62,48	17,55	12,06	7,27	76,18	105,88	0,06	0,08	1,26	7,75	0,74	isiA
High molecular weight polypeptides of PSII																								
slr1311		0,79	0,88	0,87	0,51	0,42	0,47	0,72	0,39	0,54		1,86	5,66	1,02	1,77	0,65	0,84	0,65	1,13	0,91	0,95	1,84	0,74	psbA2
sl11867	1,16	0,95	0,75	1,14	0,98	0,87	0,64	0,78	0,58	0,68		2,43	6,12	1,40	1,43	0,92	0,69	0,60	1,43	0,84	1,44	1,75	0,74	psbA3
slr0906	0,93	0,68	0,68	0,80	0,35	0,29	0,23	0,17	0,20	0,80	2,33	1,93	1,90	0,83	0,79	0,85	1,95	1,01	0,93	0,74	1,22	0,47	0,74	psbB
sl10427	0,89	0,83	0,69	0,58	0,26	0,21	0,13	0,15	0,13	0,78	3,65	0,76	0,53	0,46	0,90	0,75	1,39	1,03	0,99	0,79	0,80	0,47	0,74	psbO
sl10258	1,02	0,89	0,76	0,74	0,46	0,31	0,23	0,21	0,19	0,73	1,98	2,69	1,47	0,55	0,85	0,87	1,02	0,80	0,99	0,87	1,01	0,27	0,74	psbV
slr0927	0,85	0,99	0,88	1,11	0,86	0,66	0,50	0,55	0,41	1,03		1,36		1,14	1,04	0,94	0,93	0,73	1,11	0,94	1,44	0,94	0,74	psbD2
sl10849 <sup>e</sup>	0,85	0,95	0,84	0,99	0,83	0,59	0,41	0,76	0,37	1,04		1,09	1,37	1,02	1,20	0,70	0,93	0,80	1,30	0,93	1,00	0,98	0,74	psbD1
sl10851 <sup>e</sup>	1,04	0,80	0,79	0,88	0,75	0,56	0,29	0,28	0,10	1,00		1,12	1,40	0,73	1,12	0,58	1,06	1,09	1,23	1,00	0,65	1,05	0,74	psbC
ssr3451 <sup>f</sup>	0,96	0,91	0,81	0,99	0,68	0,45	0,33	0,30	0,22	0,87	2,31	1,29	0,89	0,68	0,94	1,00	0,68	0,66	1,41	0,95	1,07	0,41	0,74	psbE
smr000 <sup>g</sup>	1,01	1,08	0,87	0,86	0,45	0,37	0,33	0,37	0,19	0,77	2,21	1,32	1,27	0,74	1,04	1,02	0,65	0,69	1,53	0,88	1,22	0,47	0,74	psbF
Low molecular weight polypeptides of PSII																								
smr000 <sup>h</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,26	NS	NS	2,25	0,99	1,39	0,54	1,03	0,76	0,61	0,84	1,24	0,79	0,97	0,52	0,74	psbL
smr0008	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,32	NS	NS		2,34	2,63	0,59	0,95	0,89	0,66	0,67	1,16	0,76	1,28	0,40	0,74	psbJ
sl1194	0,66	0,80	0,58		0,37	0,16	0,24	0,19	0,14	0,80		4,29	4,77	0,66	1,31	0,63	1,27	1,20	0,94	0,69	0,80	0,31	0,74	psbU
sl11418	1,33	1,00	0,93	0,88	0,58	0,37	0,51	0,37	0,47	0,76		2,28	3,52	0,93	1,18	0,80	0,75	1,04	1,08	1,07	0,77	0,39	0,74	psbP2
sm10002	1,02	0,77	0,72		0,43	0,67	0,86		0,73	0,95		2,49	2,62	0,68	0,92	0,60	0,89	0,71	0,74	0,93	1,62	0,41	0,74	psbX
smr0001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,23	NS	NS		8,74	3,70	0,55	0,78		1,53	1,03	0,69			0,26	0,74	psbT
smr0009	0,99	1,01	0,76	0,85	0,66	0,62	0,48	0,33	0,60	0,66		1,04	3,99	0,84	0,95	0,57	0,82	0,83	0,64	0,80	0,95	0,40	0,74	psbN
sls2598	0,91	0,95	0,92	0,97	0,71	1,05		0,42	0,78	1,11		2,51	1,67		1,31	0,65	1,18	0,83	0,83	0,89	0,90	0,52	0,74	psbH
sm10007	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,38	NS	NS		1,60	1,60	0,68	0,76	0,70	0,95	0,82	1,03		1,13	0,31	0,74	psbY
slr2034	1,23	0,94	0,81	0,94	0,65	0,53	0,49	0,56	0,50	0,76		1,05	0,76	0,86	0,83	1,18	0,83	0,87	1,58	1,18	0,91	0,98	0,74	ycf48
slr1645	0,99	1,02	0,85	0,84	0,59	0,58	0,53	0,44	0,50	0,95		1,52	1,72	0,70	1,06	0,75	0,81	0,73	1,16	1,10	0,87	0,71	0,74	psbZ
sm10001	0,54	1,21	0,73	0,71	0,46	0,44	0,39	0,37	0,33	0,86			1,79	0,56	0,96		1,03	0,90	0,91	0,83	1,76	0,29	0,74	psbI
sm10005	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		5,30	2,15	0,78	0,76	1,08	1,75	0,63	0,81	0,87	1,50	0,94	0,74	psbK
sm10003	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		12,10	1,59	0,67	0,86	0,91		1,03	0,98	1,44		0,14	0,74	psbM
sl1398	1,20	0,95	1,10	1,04	0,79	0,65	0,74	0,72	0,72	0,93		0,97	1,11	0,85	0,82	0,77	1,41	0,89	1,07	1,21	0,64	0,92	0,74	psbW
slr1739	0,92	2,10	2,23	2,83	5,23	3,66	4,10	3,83	2,77	1,81		5,56	12,44	3,70	1,26	1,90	0,73		1,76	1,28	1,44	1,38	0,74	psb9 like
slr2399	1,37	1,19	0,97	1,01	1,06	1,01	0,86	0,56	0,98	0,88		1,26	3,12	1,08	1,64	0,81	0,56	0,80	1,06	1,09	1,15	2,10	0,74	ycf39

Phycobilisome																																											
ssl0452 <sup>2</sup>	1,14	0,92	0,71	1,63	3,15	6,01	3,63	3,07	3,33	1,63	0,43	2,05	9,13	1,89	0,72	0,91	1,04	0,94	0,74	1,01	1,06	3,35	NblA																				
ssl0453 <sup>3</sup>	1,19	0,92	0,56	0,97	1,54	2,55	1,85	3,15	1,48	1,19	0,23	6,57	49,30	3,63	1,22	1,26	1,68	0,64		1,48		6,90	NblA																				
slr2067 <sup>h</sup>	0,55	0,69	0,65	0,72	0,34	0,36	0,11	0,15	0,13	0,81	3,52	1,14	0,11	1,18	1,15	1,25	1,46	1,44	1,22	0,93	1,08	0,58	apcA																				
slr1986 <sup>h</sup>	0,48	0,68	0,67	0,75	0,39	0,28	0,11	0,20	0,11	0,73	4,31	0,50	0,18	0,50	1,09	0,56	1,63	1,52	0,97	1,00	0,81	0,56	apcB																				
ssr338 <sup>h</sup>	0,98	0,73	0,65	0,55	0,19	0,17	0,11	0,13	0,09	0,76	3,55	1,63	0,40	0,62	0,94	0,69	1,60	0,87	0,73	0,66	0,87	0,49	apcC																				
slr1577 <sup>1</sup>	0,74	0,65	0,76	0,80	0,34	0,36	0,13	0,14	0,19	0,77	2,85	0,99	0,38	0,62	1,36	0,61	1,43	1,19	1,10	0,89	0,96	0,53	cpCB																				
slr1578 <sup>1</sup>	1,00	0,74	0,69	0,72	0,26	0,26	0,21	0,28	0,18	0,68	2,38		0,59	1,27	0,99	1,20	1,70	1,07	1,02	0,86	0,98	0,64	cpCA																				
slr1579 <sup>1</sup>	1,20	0,63	0,59	0,68	0,25	0,21	0,10	0,09	0,09	0,61	3,52	3,42	1,55	0,86	0,96	1,19	1,86	1,00	0,76	0,77	1,28	0,27	cpCC2																				
slr1580 <sup>1</sup>	1,12	0,76	0,54	0,58	0,20	0,17	0,07	0,08	0,07	0,38	3,81	3,07	2,16	0,75	0,99	1,08	2,12	1,17	0,75	0,71	1,24	0,29	cpCC1																				
ssl3093 <sup>h</sup>	1,23	0,83	0,64	0,70	0,28	0,23	0,13	0,07	0,16	0,61	3,61	3,88	2,27	0,47	0,79	0,81	1,37	1,07	0,65	0,46	1,21		cpCD																				
slr0335	0,57	0,80	0,68	0,82	0,33	0,22	0,12	0,14	0,11	0,69	3,00	0,95	0,28	0,45	0,94	0,57	1,45	0,95	1,06	0,96	0,75	0,46	apcE																				
slr2051	0,69	0,70	0,73	0,91	0,55	0,29	0,26	0,21	0,25	0,71	3,03	1,86	1,35	0,57	0,88	0,66	1,41	0,87	1,00	0,76	0,88	0,35	cpCG1																				
slr1471		0,86	0,15	0,18	0,08	0,06	0,04	0,01	0,04	0,46	10,04		1,66	0,27	0,85	0,77	1,17	1,36	0,43	0,56	1,37	0,16	cpCG2																				
slr1459	0,91	0,70	0,81	0,73	0,44	0,29	0,18	0,12	0,19	0,75	3,77	1,18	0,29	0,77	0,86	1,01	1,36	0,94	1,23	0,87	0,88	0,46	apcF																				
slr1051	0,98	0,86	0,93	0,74	0,85	1,04	1,37	1,05	1,31	0,89		0,41	0,60	0,92	0,78	0,89	0,93	1,22	1,13	0,98	1,13	1,42	cpCF																				
Carotenoides																																											
slr1468	1,17	0,71	0,75	0,92	0,52	0,46	0,40	0,48	0,42	0,71		0,29	0,24	0,74	0,85	0,92	1,30	1,46	1,12	1,07	1,31	1,03	crTR																				
slr1125	0,57	0,74	0,89	0,76	0,35	0,38	0,40	0,28	0,34	0,67		0,32	0,32	0,69	0,77	0,98	0,98	1,36	1,15	0,91	1,24	0,89	alg2																				
slr0254	1,06	0,99	0,95	0,93	0,63	0,50	0,52		0,52	0,86		1,15	0,89	0,93	0,80	0,98	1,50	1,00	0,81	0,78	1,18	1,60	crTD																				
slr1254 <sup>2</sup>	1,29	1,30	1,07	1,16	1,14	1,56	1,27	1,48	1,15	1,18	1,25	2,59	1,42	0,90	0,91	0,61	1,16	1,08	1,02	1,26	3,49		crTD																				
slr1255 <sup>1</sup>	0,97	0,88	0,96	0,81	0,66	0,68	0,78	0,61	0,57	0,78		0,32	0,61	0,86	0,89	0,89	1,03	1,32	1,14	1,08	1,17		crTB																				
slr1293	1,23	0,87	0,99	0,92	1,31	1,55	0,00	1,30	0,98		4,55	5,45	1,24	0,79	0,98	0,85	0,88	1,05	0,83		4,94		crTI																				
slr0033	1,08	0,79	0,87	0,74	0,46	0,54	0,60	0,59	0,64	0,84		1,78	1,16	0,98	1,16	0,78	1,25	1,24	1,03	1,25	0,80	1,08	crTH																				
slr1963	0,84	1,22	1,81	2,31	7,08	3,12	1,54	1,77	1,01	1,10		0,77	1,03		1,34	0,54	0,40	0,27	2,76	2,62	0,78	2,09	ocp																				
slr1541	1,23	1,94	1,39	1,84	2,98	3,57	2,80	2,83	2,16	1,53		1,97	5,39	3,21	1,25	1,21	0,53	1,16	1,04	1,47	1,21	14,73	Isd like																				
Chlorophyll synthesis and heme assembly																																											
slr0749	0,64	0,65	0,61		0,24	0,17	0,22	0,14	0,17	0,57	5,44	3,63	0,74	0,82	1,22	0,77	0,34	0,20	0,72	0,60	0,69	0,12	chlL																				
slr0750	0,65	0,70	0,62		0,28	0,23	0,34	0,35	0,32	0,62	3,68	12,14	4,09	0,82	1,06	1,19	0,36	0,21	0,67		1,00	0,12	chlN																				
slr0772	0,59	0,55	0,71		0,26	0,17	0,23	0,14	0,22	0,61	5,51	3,20	1,10	0,86	0,82	1,03		0,86	1,44	1,06	0,84	0,32	chlB																				
slr0056	0,96	0,80	0,89	0,82	0,89	0,95	0,92	0,89	1,02	1,03		0,44	0,31	0,68	0,76	0,71	1,17	1,63	1,08	1,22	1,23	1,35	chlG																				
slr1091	0,54	0,68	0,84	0,72	0,63	0,41	0,26	0,35	0,28	0,94	2,81	0,18	0,07	0,61	0,65	1,06	1,70	1,60	1,47	1,01	0,90	1,02	chlP																				
slr0536	1,07	0,86	0,77	0,68	0,43	0,40	0,39	0,47	0,40	0,89		1,16	0,88	0,69	0,81	0,81	1,11	1,17	1,23	0,83	1,05	0,92	hemE																				
slr0506	0,94	0,87	0,85	0,82	0,41	0,32	0,25	0,21	0,25	0,86	2,73	1,45	0,46	0,44	0,77	1,12	1,01	0,76	0,90	0,97	1,02	0,34	por																				
slr1184 <sup>h</sup>	0,78	0,63	0,83	0,90	0,49	0,26	0,18	0,21	0,16	0,81	4,00	0,86	0,13	0,78	0,91	0,94	1,95	1,20	1,25	0,92	1,13	0,42	ho1																				
slr1185 <sup>h</sup>	0,66	0,72	0,79	0,87	0,34	0,26	0,18	0,13	0,21	0,82	5,32	1,34	0,28	0,51	1,29	0,84	1,06	0,98	1,53	1,23	1,02	0,40	hemF																				
slr1875 <sup>1</sup>	0,48	1,00	0,92	0,89	0,64	0,53	0,51	0,36	0,44	0,88		0,98	1,10	0,63	0,99	0,69	1,03	0,86	0,90	0,87	0,83	0,48	ho2																				
slr1876 <sup>1</sup>		0,81		0,72	0,70	0,38	0,49		0,44	0,96		1,31	0,67	1,30	0,86	1,12			0,77	0,88			hemN																				
slr1808	0,81	0,74	0,68	0,79	0,33	0,23	0,21	0,18	0,25	0,73	2,61	0,67	0,33	0,83	0,89	1,27	0,66		1,28	1,11	1,02	0,29	hemA																				
slr1994	1,09	1,01	0,85	0,83	0,52	0,45	0,44	NS	0,42	0,82	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	hemB																				
slr0017	0,98	0,98	0,73	0,78	0,46	0,42	0,58	0,37	0,56	0,79		0,80	0,47	0,66	0,96	0,98	0,62	0,95	1,58	1,47	1,67	0,82	hemL																				
Soluble electron carriers																																											
slr1643	0,94	0,89	0,91	0,78	0,46	0,35	0,31	0,33	0,27	0,92		0,96	0,73		0,74	0,90	0,90	0,96	1,67	1,07	0,71	0,56	petH																				
ssl0020	0,80	0,86	0,85	0,76	0,49	0,43	0,39	0,28	0,30	0,58		1,74	1,48	0,51	1,01	0,40	0,38	0,28	0,75	0,45	1,13	0,40	fedI																				
slr1796		1,15	1,31	1,36	0,20	0,34	0,09	0,08	0,11	1,08	5,33	1,15	0,84	0,24	0,64	0,41	0,77	0,84	0,06	0,09	1,78	0,18	petJ																				
slr0199	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		1,85	1,14	1,62	1,29	1,41	0,94	0,91	244,79	3,65	0,96	1,62	petE																				
slr0248 <sup>h</sup>		0,00		1,01	10,10	12,13	25,05	0,27				97,03	107,82	28,44	12,69	7,50	574,00	146,14	0,02	0,03	0,80	6,79	isiB																				
slr0249 <sup>h</sup>	0,87	1,09	1,10	0,90	1,79	9,98		3,20	0,35			11,30	41,28	10,09	4,95	4,90	167,80	121,50	0,06	0,15		4,08	ho																				
slr0741	1,09	1,01	1,41	1,09	0,97	1,31	1,22	1,51	1,52			5,32	2,57	0,86	0,96	1,06	1,13		1,07	0,96	0,93		nifJ																				
slr1584	1,03	0,99	1,04	1,08	0,82	0,87	0,73	1,07	1,02			0,88	0,59	0,68	0,89	0,92	0,79	0,66	1,19	1,20	0,93	0,35	fdsB																				
ATP synthases																																											
slr1321 <sup>m</sup>	0,77	0,76	0,75	0,60	0,17	0,22	0,18	0,24	0,16	0,77	2,54	0,30	0,17	0,42	0,97	0,65	1,21		2,70	0,81	1,03	0,80	0,74	ho																			
slr1322 <sup>m</sup>	0,60	0,68	0,86	0,55	0,28	0,20	0,20	0,15	0,13	0,59	3,50	0,29	0,11	0,37	1,10	0,53	1,12		2,56	0,71	1,03	0,85	atpI																				
ssl2615 <sup>m</sup>	0,57	0,73	0,83	0,63	0,23	0,26	0,19	0,22	0,17	0,65	3,72	0,28	0,11	0,34	0,77	0,51	1,10	1,62	0,96	0,99	0,75	0,56	atpH																				
slr1323 <sup>m</sup>	0,80	0,85	0,86	0,51	0,20	0,22	0,20	0,14	0,17	0,64	3,74																																

slr0513	0,94	0,74	2,23	0,94	0,17	0,25	0,61	0,57	1,04	0,78	NS	43,30	101,98	1,77	1,84	0,56	21,97	14,81	0,11	0,15	2,82	3,68	idiA2										
slr1390	1,11	1,32	1,40	1,47	2,83	2,35	2,21	NS	2,23	1,28		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ftsH										
slr0228	1,27	1,18	0,85	1,19	1,31	1,10	0,90	1,10	0,99	1,10		0,88	3,89	2,96	0,90	1,26	0,57	0,55	0,94	0,60	1,40	3,72	ftsH										
slr1604	1,34	1,52	0,78	1,21	2,34	1,52	1,24	1,35	1,29	1,27		0,59	2,42	2,74	1,02	0,07	0,74	0,67	1,05	0,62	1,41	6,50	ftsH										
slr1967	1,02	1,25	1,26	1,23	1,91	1,98	1,93	2,13	1,81	1,20		0,81	1,26	1,27	1,67	1,13	0,95	0,80	1,01	1,20	1,03	2,66	ycgA										
slr1968	1,09	1,12	1,19	1,39	2,61	2,35	1,72	1,39	1,61	1,41		0,50	1,05	0,92	1,08	0,69	1,20	0,96	1,06	1,05	0,68	1,73	pmgA										
slr1969	1,38	2,28	1,58	1,80	3,29	3,29	2,43	2,15	1,86	0,82		0,46	0,40	0,70	1,07	0,66	0,96	1,15	0,91	1,10	0,78	0,78	ho										
ssr2016	2,80	2,38	0,29	0,97	0,90	0,90	0,84			0,82		21,40	203,45	2,49	1,25	2,51	2,34	0,41			1,06	3,13	9,62	pgr5									
Cytochrome oxidase																																	
slr1899	0,91	0,72	0,79	1,03	0,80	0,79	0,89	0,76	0,95	0,98		NS	0,31	0,25	0,90	0,95	0,79		1,66	1,12	1,04	1,40		ctaB									
slr2082	1,23	0,86	0,83	0,99	0,66	0,69	0,68		0,62	0,84	0,57		0,30	0,70	0,76	0,99	1,31	1,24	1,26	1,01	0,92	1,24		ctaDII									
slr1379	0,82	0,97	0,82	1,09	1,07	0,77	0,74	0,60	0,74	1,26	0,46		0,43	0,80	1,21	0,82		1,06	0,60	0,82	0,90	0,91		cydA									
slr1380	1,04	1,07	0,82	1,13	1,19	1,08	0,87	0,58	1,11	1,12	0,36		0,54	0,93	1,34	0,80		1,03	0,69	0,78	0,78	1,19		cydB									
NADH dehydrogenase																																	
complex I																																	
slr0026	1,05	0,73	0,70	0,63	0,39	0,36	0,41	0,38	0,52	0,65	NS		0,33	0,46	0,53		0,89	0,82	1,02	1,30	1,19	0,92	1,26	0,81	ndhF4								
slr0027	0,87	0,81	0,88	0,96	0,88	0,77	0,74		0,95	0,92			0,29	0,68	0,58	0,81	0,79	0,22	1,14	1,15	1,06	1,07	1,01		ndhD4								
slr1732	1,27	1,12	0,91	0,82	0,62	2,28	1,08	NS	1,20	0,40			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		ndhF3								
slr1733	1,25	1,08	0,86	0,91	0,59	2,28	1,04	NS	0,89	0,34			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		ndhD3								
slr1734	1,11	1,18	0,91	0,88	0,73	1,80	1,01	0,86	0,95	0,38		0,09	0,70	0,56	1,04	0,95	0,09	1,58	0,85	0,86	2,79	3,65		cupA									
slr1735	0,56	1,14	0,95	0,74	0,61	1,27	0,78	0,84	1,02	0,46		0,18	0,51	0,67	1,05	0,91	0,11	1,38	0,84	1,06	2,45	2,82		ho									
slr0519	0,92	0,90	0,90	0,99	0,85	0,94	0,90	0,84	0,99	0,83		0,34	0,89	0,70	1,00	0,71	0,44	0,78	1,24	1,07		1,12	1,76	ndhA									
slr0520	1,16	0,88	1,04	0,92	0,91	0,89	0,76	0,86	0,84	0,91		0,32	0,40	0,73	0,82	0,79	0,47	1,51	1,28	1,02	1,19	1,64		ndhI									
slr0521	0,96	0,89	1,01	1,06	0,95	1,02	0,92	0,62	0,95	0,88		0,29	0,45	0,58	1,10	0,67	0,44	1,11	1,07	0,99	1,09	1,08		ndhG									
slr0522	1,03	0,87	0,97	0,99	0,72	0,80	0,71	0,74	0,59	0,88		0,29	0,36	0,58	0,82	0,68	0,41	1,63	1,25	0,95	1,27	1,27		ndhE									
slr1279	0,75	0,89	0,98	1,14	0,84	1,03	0,72	0,73	0,68	0,90	0,52	0,48	0,46	0,93		0,25	1,18	1,19	1,13	1,02	0,84		ndhC										
slr1280	0,91	0,88	0,98	1,22	0,97	1,08	0,77	1,00	0,71	0,93	0,52	0,30	0,72	0,69	0,92	0,29	1,00	1,50	1,20	1,17	1,65		ndhK										
slr1281	1,03	0,98	0,89	0,93	0,77	0,80	0,67	0,74	0,63	0,96	0,77	0,80	0,57	0,70	0,69	0,41	1,26	1,38	1,17	1,23	1,49		ndhJ										
slr0223	1,11	0,74	0,85	0,90	0,71	0,81	0,93	0,97	0,95	0,78	0,43	0,35	0,30	0,82	0,80	0,97	0,39	1,43	1,47	1,13	1,14	1,83	ndhB										
slr1291	1,37	2,95	1,39	2,84	3,69	6,98	4,47	5,14	4,00	1,13		0,41	5,15	0,69	0,89	0,79	0,37	1,46	1,00	1,18	2,18	21,28	ndhD2										
slr2006	0,75	1,32		0,53	0,42	1,69	0,47	0,28	0,45	0,60		0,37	4,14	0,58	1,60	0,73	0,44	2,26	0,50	0,33	2,92	1,64	ho										
slr2007	1,12	1,43	0,66	0,73	0,55	1,29	0,68		0,82	0,63		0,20	2,44	0,60	1,28		0,35	1,70	0,60		3,04	1,64	ndhD5										
slr2008	1,00	1,11	1,18	0,98	1,27	1,73	1,15	1,18	0,82	0,95		0,26	1,44	0,67	0,93	0,74	0,36	1,33	1,05	0,57		3,26	1,10	ho									
slr2009	1,14	0,89	1,12	1,10	3,01	3,26	3,24		3,33	0,89		0,15	0,75	0,53	0,78	0,76	0,43	2,18	0,82	0,76	3,02	2,30	ndhD6										
slr2010	0,81	1,30	0,92	0,86	0,93	1,35	0,95	0,79	0,79			0,10	0,61	0,54	0,97	0,56	0,48	1,90	0,74	0,64	2,10	1,50	ho										
ssr3405	1,13	1,14	0,86	0,81	0,93	1,22	0,98	0,62	0,72	0,76		0,64	0,61	0,52	0,91	0,71	0,74	2,39	0,80	0,77		1,08	1,71	ho									
ssr341	0,65	1,32	0,91	0,92	0,91	1,35	0,94	0,91	0,91	0,75		0,23	0,59	0,60	0,79	0,84	0,38	1,97	1,06	0,68		3,40	1,22	ho									
slr2011	0,87	1,21	1,01	0,90	1,11	1,13	0,98	0,75	1,02	0,86		0,23	0,87	0,72	1,37	0,79	0,40	1,52	1,00	0,80		1,96	1,64	ho									
slr2012	0,82	1,22	0,99	0,92	0,95	1,14	1,12		0,96	0,87	0,87	0,96	0,90	0,74	0,94	0,42	1,28	0,78	0,75		3,01	0,78	ho										
slr2013	0,91	1,03	1,01	0,95	1,20	1,13	0,99	1,67	1,08	0,91	1,18	1,05	1,01	0,82	0,86	0,38	1,40	0,88	0,85		2,26	1,45	ndhM										
slr1623	1,32	1,02	1,20	1,02	0,87	1,40	1,58	1,87	1,38		0,30	0,17	0,87	0,99	0,97		1,28	1,32	0,97	1,01	1,41	ndhN											
slr1262	1,06	0,72	0,82	0,85	0,63	0,58	0,62	0,45	0,75	0,80	0,96	0,65	0,84	1,03	1,16		0,72	1,11	1,07	0,94	1,05	0,92											
NADH type2																																	
slr0851	0,99	1,05	0,93	0,98	1,25	1,37	1,51	1,33	1,67	1,12	0,44	1,59	0,95	0,74	0,99	1,40	1,19	1,36	0,77		0,91		ndbA										
slr1743	1,25	1,59	1,38	1,66	1,79	2,83	2,66	3,42	2,30	1,63		1,32		1,86	0,78	0,89	0,58	0,83	1,31	0,97		1,52		ndbB									
slr1484	1,12	0,82	0,90	0,87	0,74	0,91	0,93	1,61	0,83	0,95		0,44	0,69	0,83	0,82	0,76	1,31	1,42	0,87	1,08	0,93	1,27		ndbC									

Strain and treatment	WT : Cd WT : SC										1738:Cd WT : Cd	WT : H2O2 WT : SC					WT : Fe- WT : SC		WT : Fe+ WT : SC		WT : Zn+ WT : SC		Gene name		
	15'	30'	60'	75'	90'	180'	300'	300b'	360'	960'	180'	15'	30'	180'	300'	420'	1-0	2-0	240'	360'	30'	240'			
C: METAL TRANSPORT AND BINDING																									
Possible Cobalt regulon																									
slf0037	0,82	0,37	0,52	0,43	0,29	0,40	0,34	0,22	0,43	0,95	2,26	0,49	0,31	0,60	0,92	0,67	1,04	1,39	0,37	0,51	0,55	0,53	cbiX		
slf0381 <sup>a</sup>	1,02	2,20	0,40	0,18	0,33	0,41	0,21	0,03	0,31	0,93	6,60	0,31	0,38	0,67	1,27	0,70	1,30	1,36	0,12	0,13	0,24	0,28	ho		
slf0382 <sup>a</sup>	0,94	0,16	0,29	0,15	0,16	0,20	0,17	0,07	0,22	0,75	6,74	0,85	0,48	0,87	0,84	0,99	1,60	1,37	0,18	0,17	0,37	0,36	ho		
slf0383 <sup>a</sup>	1,19	0,24	0,36	0,29	0,30	0,30	0,22	0,27	0,31	0,74		0,50	0,41	0,88	0,99	0,82	1,27	1,74	0,56	0,37	0,69	0,58	cbiM		
slf0384 <sup>a</sup>	1,06	0,42	0,47	0,57	0,73	0,68	0,59	0,11	0,80	0,84	3,98	0,34	0,20	0,89	1,04	1,01	1,02	1,46	0,20	0,24	0,62	0,38	cbiQ		
slf0385 <sup>a</sup>	1,15	0,51	0,66	0,54	0,65	0,64	0,57	0,19	0,71	0,87		0,31	0,59	1,00	1,93	0,72	0,91	1,32	0,60	0,60	0,53	0,57	cbiQ		
Ni Co Zn cluster																									
slr0793 <sup>b</sup>	1,43	2,70	1,05	3,92	2,58	3,87	2,29	NS		1,17	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	nrsB		
slr0794 <sup>b</sup>		2,03	0,96	2,41	2,06	1,78	1,06	1,69	1,50	1,57		1,19	1,20	1,00	0,74	1,09		1,57	0,66	1,03	86,72	11,94	nrsA		
slr0795 <sup>b</sup>	1,06	1,99	0,98	2,41	1,29	1,49		2,26	1,10	1,26		0,17	0,19	2,25	0,91	1,21	0,85		1,00	1,26	79,83	25,68	nrsC		
slr0796 <sup>b</sup>	0,97	2,27	1,91	3,02	5,08	4,75	3,78	7,60	3,00	1,24		1,92	1,65	1,21	0,88	1,44	1,67	0,96	2,19	1,38	4,90	2,69	nrsD		
slf0794	1,02	1,16	1,10	1,33	1,63	1,73	1,55	2,46	1,82	1,41		2,67	1,47	1,61	1,06	1,86	1,41	0,75	1,15	1,19		5,32	corR		
slr0797	1,24	2,33	2,23	1,24	1,91	1,49	0,83	0,74	1,00	1,10		1,22	3,00		1,46		1,97	1,52		1,11		195,73	corT		
slf0793 <sup>c</sup>	1,78	2,44	2,48	2,75	2,32	2,61	1,89	2,69	2,07	2,99		1,14	1,29	1,29	0,84	1,13	1,61	1,56	1,07	0,85		5,72	ziaB		
slf0792 <sup>c</sup>		2,82	3,16	2,91	3,44	3,82	5,14	3,91	4,27	4,06	2,59		1,41	1,51	1,27	0,91	1,32	1,90	1,51	0,62	0,94		4,81	ziaR	
slr0798		2,55	5,06	3,18	4,24	2,52	3,31	2,11	3,05	1,29	1,86		1,50	1,54	1,23	1,14	0,96	12,88	4,82	0,57	0,63		49,30	4,40	ziaA
Znu cluster																									
slr2043 <sup>d</sup>		0,59	0,34	0,82	0,41		0,65		0,66	1,22		1,71	1,11	0,86	1,02	1,23	0,42	0,55	1,27	1,70		0,23	0,63	znuA	
slr2044 <sup>d</sup>	1,20	0,83	0,78		0,59	0,79	0,84		0,72	0,86		1,45	1,14	0,69	0,87	0,78	0,70	0,79	0,90	1,41	0,50	0,63	znuC		
slr2045 <sup>d</sup>		0,92	0,74	0,73	0,95	1,02	1,05		1,51	0,88		1,32	1,54	0,64	1,05	0,93	0,96	0,85	0,87	1,17	0,68	0,65	znuB		
Ars cluster																									
slr0944 <sup>e</sup>	1,13	2,78	2,05	3,39	9,26	9,29	8,56	30,78	7,67	2,19	0,42	1,48	1,39	0,88	0,85	0,96	0,76	1,04	1,02	1,07	1,19	10,27	arsB		
slr0945 <sup>e</sup>	0,73	8,24	6,68	8,66	29,47	31,18	25,42	49,07	23,80	4,57	0,44	0,93	1,48	0,79	1,30		1,01	0,97	0,78	0,93		40,37	arsH		
slr0946 <sup>e</sup>		4,48	2,05		16,21	12,30	15,08	34,14	10,47	1,20	0,19	0,85	1,87	1,09	0,66		0,95	1,00	0,80	1,00		5,28	arsC		
Mn transport and regulation																									
slf1598 <sup>f</sup>	1,06	0,88	0,85	0,87	0,62	0,58	0,55		0,47	0,62		2,03	1,86	0,42	0,55	0,52	0,76	0,21	1,01	0,32	0,96	1,85	mntC		





slr0076 <sup>d</sup>	0.68	1.95	1.49	1.86	4.73	3.45	2.74	4.73	1.74	0.85	0.37	0.65	0.95	2.06	1.27	1.55	0.40	0.53	1.38	1.66	2.21	5.42	suFD	
slr0077 <sup>d</sup>	0.77	1.40	1.28	1.45	3.17	2.30	1.79	2.43	1.72	0.94		0.25	0.48	1.58	1.56	1.86	1.19	0.62	0.60	1.34	1.68	2.16	5.24	suFS
slr1417	1.07	1.40	1.32	1.48	1.84	2.03	1.44	1.57	1.33	1.30			2.91	2.65	1.62	1.05	1.24	0.77	0.88	0.99	0.84	1.08	2.14	suFA
Dehydrogenases/rieske/detoxification and redox functions																								
slr1621	0.67	0.88	0.81	0.54	0.62	1.50	0.97	1.36	1.40	0.75	5.85	37.70	16.33	5.97	4.43	4.86	0.69	1.50	1.19	1.89	1.72		ahpC	
slr1159	1.28	0.36	1.45	3.21	1.72	3.58	3.84	5.54	4.47	5.27	0.20	7.07	0.26	2.36	1.91	3.12	0.98	1.15	1.13	1.61	1.14	1.17	ahpC like	
slr1516	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2.19	NS	NS		0.99	1.00	1.66	1.00	1.36	0.12	0.44	2.11	1.65	1.16	2.73	sodB	
slr0217 <sup>a</sup>	1.28	1.09	0.97	1.04	0.81	1.28	2.44	3.14	3.00	1.21		1.40	1.70	1.15	0.79	1.36		3.44	0.65	0.77	1.08	2.97	flv4	
slr0218 <sup>a</sup>	2.45	1.02	0.54		1.13	4.78	4.44	6.06	3.53	0.54	0.35	0.44			0.43	0.97	0.03	3.59	0.61	1.74		5.84	ho	
slr0219 <sup>a</sup>		1.03	0.73	1.17	1.11	1.85	1.70		1.65	0.80	0.34	0.24	1.56	0.91	0.77	1.16		3.89	1.10	1.13	1.34	6.39	flv2	
slr1521	0.90	1.09	1.03	0.89	0.63	0.72	0.82	0.78	0.76	0.89		1.58	2.44	0.81	0.87	0.93	0.74	1.29	1.04	1.02	0.96	0.57	flv1	
slr0250	0.91	1.00	1.06	0.96	0.99	0.91	1.00	0.80	1.02	0.99		0.37	0.65	0.93	1.48	1.20		3.23	3.32	1.53	1.26	1.55	1.31	dfp
slr0264	0.89	1.26	1.09	1.20	1.70	1.89	2.05	2.26	1.75	1.52		0.74	1.50	1.08	1.16	1.01	1.41	0.79	0.76	0.75	0.93	1.39	vanA	
slr1849	1.08	0.90	1.05	1.04	1.26	1.46	1.76	2.07	2.10	1.03		1.77	0.94	6.99	2.29	3.73	0.95	0.72	1.11	1.18		1.10	vanA like	
slr1869	0.78	0.81	0.84	0.84	0.60	0.51	0.59	0.45	0.69	0.82		0.62	0.47	0.89	0.92	1.13	1.28	1.44	1.01	1.14		1.50	cbab	
slr1167	0.85	1.03	1.17	1.26	1.97	1.57	2.23	2.35	2.47	1.07		0.82	0.93	1.87	1.00	1.32	0.78	0.60	1.81	1.14	0.82	0.79	glcA	
slr1519 <sup>f</sup>	1.09	1.21	1.27	1.32	1.79	2.06	2.34	2.21	2.26	1.25		0.79	1.99	1.07	1.04	0.93	0.89	0.63	1.17	1.50	0.67	2.51	ho	
slr1520 <sup>f</sup>		1.01	1.01	0.95	1.42	1.67	1.92	1.98	2.20	1.09		1.06	1.37	0.60	1.31	0.98	0.92	0.84	0.89	1.16	1.09	2.72	fucO	
slr0330	1.02	1.82	1.33	1.22	2.25	7.33	9.24	17.85	11.90	4.26		9.10	13.30	4.65	1.21	0.82	0.64		0.90	3.08	1.30	7.36	fabG	
slr0886	0.95	0.89	0.92	0.75	0.50	0.42	0.41	0.43	0.43	0.75		0.99	0.42	0.79	0.78	1.39	1.01	1.42	0.95	0.99	0.92	0.41	fabC	
slr1051	0.86	0.97	0.98	0.79	0.44	0.39	0.48	0.38	0.35	0.84	2.31	0.50	0.43	0.59	0.78	0.76	0.54	0.95	1.28	1.03	0.84	0.42	fabI	
slr1791	1.08	0.98	1.08	0.76	0.74	0.83	1.02	0.92	1.25	1.13		0.49	0.36	0.98	1.50	0.87	0.91	1.12	1.33	1.51	1.05	1.06	cysH	
slr1058	0.96	0.87	0.79	0.95	0.40	0.41	0.44	0.38	0.42	0.67		2.12	2.74	0.74	1.39	0.89	0.90	0.60	1.36	1.23	0.81	0.38	dapB	
slr1440	0.95	0.87	0.78	0.64	0.57	0.54	0.57	0.50	0.78	0.83		0.80	0.86	0.69	0.69	0.98	1.14	1.00	0.94	0.91	1.42	0.59	pdxH	
slr0782	0.86	0.86	0.78	0.81	0.54	0.50	0.51		0.50	0.72		1.41	1.30	0.90	0.93	1.09	0.83	0.73	0.95	0.92	1.34	0.78	yobN	
slr1517	0.86	0.91	0.98	0.83	0.54	0.74	0.83	0.80	0.94	0.89		0.60	0.30	1.00	1.04	1.26	0.90	1.22	1.34	1.17	1.44	1.22	leuB	
slr1556	0.86	1.06	1.11	1.25	1.32	1.19	1.39	1.13	1.54	1.04		2.00	2.06	1.32	0.93	1.12	1.03	0.80	0.70	0.71	1.26	0.90	ldhA like	
slr2123	1.06	0.91	1.04	1.21	1.38	1.17	1.41	1.50	1.15	0.94		1.12	0.65	1.20	0.86	1.00	0.97	1.02	1.13	1.19	1.11	2.44	serA like	
slr1755	1.10	0.92	0.90	0.97	0.82	0.95	0.87	1.05	0.86	0.97		0.49	0.49	0.78	0.89	0.93	1.31	1.04	1.10	1.00	0.97	0.64	gpsA	
slr0682	0.99	1.26	1.09	1.23	1.65	2.24	2.18	3.16	1.76	1.27		1.89	1.80	1.33	0.80	0.92	0.87	0.83	0.93	0.97	1.11	1.54	hisD	
slr1908	0.89	0.95	0.83	0.85	0.60	0.74	0.82	0.56	0.97	1.07		0.46	0.51	0.64	1.00	0.79	1.06	1.03	1.20	1.54	0.86	0.72	serA	
slr1085	1.20	1.07	0.92	1.02	0.87	1.18	1.71	2.63	1.48	1.42		0.32	0.81	0.78	1.30	0.82	1.39	1.02	0.71	1.23	0.50	1.66	glpD	
slr1308	0.74	0.60	0.63		0.39	0.30	0.41	0.24	0.47	0.66		0.88	1.04	0.76	0.79	0.97	0.89	1.44	0.89	0.95	0.19		dH like	
slr0815 <sup>a</sup>	0.94	0.98	1.05	0.94	0.86	0.86	0.86	0.50	0.95	0.99		0.48	0.43	0.83	1.12	0.93	0.86	1.31	0.84	1.08	1.42	1.43	unk	
slr0816 <sup>a</sup>	1.17	0.97	1.04	0.90	0.93	0.96	0.97	0.54	1.06	1.03		0.39	0.59	0.80	1.02	1.04	0.91	1.34	0.83	1.21	1.04	1.31	iolG	
slr0817 <sup>a</sup>	0.84	0.91	1.04	1.01	1.16	1.10	1.20	0.59	1.20	0.99		0.34	0.72	0.52	1.11	0.86	0.94	0.79	1.01	1.33	0.87	1.45	miaA	
slr1208 <sup>a</sup>	1.22	1.02	0.88	1.03	0.62	0.55	0.66	0.66	0.56	0.82		1.27	2.46	0.84	0.77	1.22	0.65	0.66	1.27	0.96	1.10	0.48	fabG like	
slr1209 <sup>a</sup>		1.07										0.92	6.33		0.83	1.06	0.64	0.72	1.13	1.17	0.90	0.33	ho	
slr1987	1.16	0.84	0.88	0.94	0.66	0.66	0.74		0.76	0.91		1.70	1.15	1.07	0.89	0.94	1.31	1.22	1.14	1.00	0.67	0.55	katG	
slr1615	0.99	0.97	1.03	0.99	1.09	1.04	1.24	1.72	1.37	0.80		1.69	2.03	2.13	0.94	1.40	0.96	0.75	1.00	0.87	1.02	1.11	thdF	
slr0450	1.22	1.03	0.88	0.95	0.70	0.58	0.75		0.77	1.34		8.85	3.52		1.36	0.82	2.86	0.53	1.17	1.41	1.10	0.37	norB	
Hydrogenase																								
slr0322	1.55	0.89	0.86	0.79	0.55	0.59	1.04	0.87	1.11	0.72		0.56	0.87	0.62	1.30	0.63	0.29	0.68	1.38	1.46	0.78	0.57	hypF like	
slr1675	0.67	2.55	1.45	1.80	6.45	5.14	3.80	10.52	3.56	1.35		0.93	6.88	5.89	1.80	2.73	0.47	0.54	1.41	1.38	1.13	5.84	hypA1	
slr1077 <sup>b</sup>	0.65	2.43	1.98	1.06	0.99	0.34	0.40	0.26	0.57	1.20	2.94	0.22	0.26	0.23	1.19	1.81	1.43	1.42	0.44	0.54	1.32	0.61	speB2	
slr1078 <sup>b</sup>	0.45	2.07	1.70	0.84	0.59	0.21	0.22	0.23	0.22	1.39	3.90	0.41	0.15	0.24	1.40	1.86	1.31	1.11	0.25	0.37	1.61	0.49	hypA2	
slr1079 <sup>b</sup>	0.61	2.35	2.35	1.08	0.90	0.26	0.29	0.23	0.28	1.33	1.87	0.56	0.15	0.35	1.27	1.50	1.18	1.19	0.34	0.38	1.62	0.55	hypB	
slr1080 <sup>b</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.20	NS	NS	2.62	1.09	0.62	0.32	1.15	1.62	1.73	1.37	0.58	0.42	1.33	0.49	ssuA	
slr1081 <sup>b</sup>	0.67	2.31	2.06	1.00	1.02	0.35	0.45	0.25	0.64	1.16		0.59	0.31	0.30	1.64	1.84	2.41	0.97	0.36	0.41	1.05	0.45	ssuC	
slr1461 <sup>f</sup>	1.19	1.00	1.20	1.42	1.82	1.75	1.60	2.15	1.49	1.33		0.45	0.67	1.02	0.73	0.81	0.92	1.01	1.00	1.16	0.74	1.50	ho	
slr1462 <sup>f</sup>	1.07	1.25	1.35	1.63	2.82	2.95	2.52	2.43	1.83	1.54		0.48	0.64	1.35	1.16	0.75	0.75	0.76	1.10	1.34	0.96	1.70	hypE	
slr2135 <sup>f</sup>	0.84	0.72	0.66	0.65	0.41	0.50	0.55	0.38	0.52	0.87	2.30	1.38	0.71	0.41	0.62	0.44	0.36	0.89	1.13	0.73	1.26	0.		

slr1029 <sup>d</sup>	1,32	0,82	0,77	0,85	0,40	0,42	1,09	0,99	0,75	0,51	0,27	0,62	0,37	1,14	0,51	0,55	0,72	1,81	1,66	0,78	0,37	ccmK1	
slr1030 <sup>d</sup>	0,71	0,98	0,81	0,69	0,36	0,35	1,07	0,91	0,75	0,51	0,57		0,44	0,95	0,73	0,50	0,76	1,67	1,54	1,05	0,39	ccmL	
slr1031 <sup>d</sup>	1,01	0,86	0,89	0,93	0,72	0,78	1,18	0,81	1,27	0,88	0,22	0,82	0,52	1,77	0,63	0,56	0,60	1,74		0,75		ccmM	
slr1032 <sup>d</sup>	1,26	0,93	0,82	0,82	0,55	0,51	1,08	0,91	0,87	0,60	0,15	0,73	0,53	1,13	0,70	0,22	0,63	1,47	1,86	0,72	0,46	ccmN	
slr1839	0,92	0,88	0,69	0,72	0,44	0,36	0,39	0,38	0,52	0,79	0,42	0,29	0,54	0,80	0,90	0,78	1,11	1,17	1,13	1,09	0,47	ccmK4	
slr1525	0,87	0,78	0,98	0,91	0,61	0,34	0,24	0,34	0,26	0,71	0,88		0,81	0,74	1,35	0,86	0,75	1,77	1,16	1,00		prk	
slr1342	0,90	0,78	0,93	0,81	0,61	0,49	0,42	0,56	0,50	0,83	1,38	0,59	0,57	0,80	0,88	1,15	1,50	1,09	0,97	1,04	0,88	gap2	
slr0783 <sup>+</sup>	1,12	0,77	0,86	0,71	0,40	0,44	0,45	0,50	0,57	0,83	0,51	0,35	0,60	0,85	1,01	1,24	1,34	0,95	1,22	1,05	0,88	tp1	
slr0784 <sup>+</sup>	0,87	0,79	0,87	0,85	0,69	0,79	0,59	0,45	0,68	0,80	0,37	0,62	0,54	0,82	0,81	1,15	1,70	0,78		1,33	1,00	ho	
slr0934	0,95	1,10	1,12	0,96	2,22	1,35		1,37	1,34	1,08	0,91	0,88	1,11	1,30	1,06	0,72	0,85	1,28	1,03	0,78	1,23	ccmA	
Regulatory functions																							
slr2031	0,81	1,12	1,06	1,30	2,13	1,62	1,27	0,75	1,58	1,08	1,08	1,28	0,97	1,13	0,94	1,42	1,32	1,19	1,02	0,98	0,98	rsbU	
ssl0707	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,32	NS	NS	0,57	0,38	0,64	0,79	1,02	2,77	1,49	0,39	0,49	0,67	0,59	P-II	
slr1529	1,53	1,81	1,41	1,14	1,46	1,74	1,48	1,08	1,74	1,97	0,85	1,53	0,73	0,74	0,82	0,68	0,92	0,79	0,89	0,95	0,67	ntrC like	
slr1860	0,80	0,95	0,86	0,79	0,79	0,46	0,40	0,33	0,32	0,86	2,00	0,79	0,88	0,83	1,13	0,97	1,90	0,79	0,98	1,25	0,74	icfG	
slr0359	1,37	1,17	1,17	0,84	0,33	0,21	0,21	0,23	0,15	0,84	1,78	2,59	0,81	1,00	1,23	0,63	0,77	0,93	0,77	0,84	0,56	ho	
slr0822	0,97	0,89	0,71	0,57	0,26	0,19	0,17	0,21	0,18	0,68	2,71	0,60	0,21	0,74	1,23	1,44	0,84	1,30	0,71	1,01	0,77	0,49	ho
slr0030	1,06	0,95	0,99	0,99	0,81	0,94	0,91		0,87	0,72	0,84	1,23	1,49	0,82	1,15	0,16	1,24	1,05	0,88		0,89	cmpR	
Glycolysis																							
slr0952	0,84	1,13	1,37	1,54	3,17	2,77	2,37	3,24	2,56	1,21	1,06	0,58	1,71	0,90	1,21	0,63	0,66	1,22	1,21	1,07	1,07	fbpII	
slr2094	1,11	0,84	0,62	0,72	0,31	0,26	0,18	0,20	0,16	0,56	0,51	0,73	0,41	0,74	0,63	0,62	0,78	1,28	1,13	0,87	0,51	fbpI	
slr1196	0,66	0,85	0,85	0,86	0,61	0,53	0,70	0,53	0,65	0,99	2,09	3,51	1,19	0,76	0,89	1,20	2,47	1,04	0,78	0,91	1,04	0,29	pfkA
slr0745	0,78	0,82	1,07	1,13	1,23	1,12	1,38		1,17	1,07	5,92	2,40	1,61	0,93	1,16	0,93	0,57	0,93	0,99		0,69	pfkA	
slr1275	1,12	0,89	0,81	0,69	0,52	0,54	0,56	0,40	0,65	0,75	1,32	1,95	0,76	0,99	0,95	0,85	0,66	0,96	1,10	0,83	0,71	pyk2	
slr0394	0,82	0,82	0,77	0,68	0,37	0,27	0,29	0,23	0,33	0,68	0,27	0,69	0,62	1,10	0,73	1,09	1,19	0,98	0,80	0,69	0,90	pgk	
slr0752	0,92	0,67	0,57	0,46	0,46	0,24	0,39	0,39	0,33	0,40	0,37	0,19	0,48	0,90	0,68	0,97	1,31	1,23	0,96	0,75	0,58	eno	
slr1945	1,13	0,70	0,72	0,67	0,40	0,34	0,34	0,29	0,35	0,66	0,48	1,23	0,67	0,89	0,67	1,08	0,88	1,36	1,29	0,81	0,91	gpmA	
slr1124	1,02	0,76	0,78	0,58	0,26	0,26	0,26	0,21	0,29	0,63	0,29	0,38	0,55	0,79	0,83	1,00	1,14	0,87	1,12	1,05	0,55	gpmA	
slr0783	1,12	0,77	0,86	0,71	0,40	0,44	0,44	0,50	0,57	0,83	0,51	0,35	0,6	0,85	1	0,95	1,34	0,95	1,22	1,05	0,88	tpiA	
slr0018	0,92	0,74	0,89	0,82	0,53	0,43	0,34	0,59	0,34	0,74	0,86	0,68	0,97	0,96	1,06	0,75	1,00	1,26	0,94	0,82	0,92	fbaA	
slr1349	1,07	0,87	1,00	0,89	0,96	0,81	0,85	0,85	0,87	0,98	0,46	0,33	0,85	0,96	0,82	1,09	1,47	0,99	1,08	0,83	1,38	pgi	
slr1350	1,31	1,21	1,35	2,00	1,80	1,21	0,76	0,93	0,55	0,78	0,34	0,15	0,97	0,90	1,00	0,78	1,40	1,04	0,98	1,16	1,99	desA	
Pyruvate and acetyl-CoA metabolism																							
slr0920	0,98	0,83	0,94	0,88	0,67	0,53	0,61	0,56	0,55	0,82	0,21	0,60	0,69	1,09	0,80	1,15	0,99	0,96	1,16	0,72	0,75	ppc	
slr0301	0,66	1,01	0,94	1,18	1,07	1,17	0,90		0,88	1,28	41,03	10,75	1,29	0,76	0,93	1,04	0,58	0,97	1,13			ppsA	
slr1019	1,08	1,03	0,85	0,89	1,02	1,14	1,27	1,44	1,36	0,89	1,19	1,45	1,08	0,85	1,07	1,01	1,12	1,03	0,85	0,82	2,16	gloB	
slr0091	1,02	0,90	1,13	1,09	1,11	0,99	1,04	1,68	0,93	1,03	0,54	0,69		1,14	1,10	0,89	0,87	1,07	1,21	1,03	2,94	aldH	
slr0542	1,01	0,83	0,83	0,95	0,76	0,72	0,75	0,55	0,91	0,99	0,91	0,70	0,66	1,14	0,77	0,94	1,09	0,89	1,06	0,74	0,48	acs	
Pyruvate dehydrogenase																							
slr1096 <sup>+</sup>	1,20	0,84	0,79	0,74	0,32	0,30	0,33	0,32	0,29	0,75	0,93	0,55	0,64	0,78	0,86	0,58	0,85	1,53	1,19	1,08	0,43	pdhD	
slr1097 <sup>+</sup>	0,88	0,89	0,73	0,59	0,34	0,36	0,36	0,29	0,35	0,70	0,85	1,01	0,52	0,72	0,76	0,63	0,95	1,46		1,08	0,30	ho	
slr1098 <sup>+</sup>	0,90	1,01	0,83	0,83	0,50	0,43	0,45	0,25	0,49	0,74	0,99	1,74	0,50	0,95	0,56	0,79	0,70	1,14	1,19	0,75	0,45	ho	
slr1934	1,28	0,94	0,91	0,83	0,55	0,44	0,46	0,45	0,45	0,95	0,39	0,37	0,58	0,96	0,65	0,79	1,28	0,99	1,16	0,94	0,58	pdhA	
slr1721	0,89	0,95	0,98	0,80	0,63	0,50	0,60	0,55	0,58	0,88	0,57	0,27	0,63	0,91	0,99	0,96	1,02	1,45	1,25	1,18	0,58	pdhB	
slr1841	1,14	0,91	0,78	0,77	0,50	0,57	0,62	0,69	0,69	0,80	0,53	0,66	0,68	0,99	0,84	0,71	1,06	1,17	1,36	0,78	0,68	pdhC	
Pentose phosphate pathway																							
slr1070	0,89	0,88	0,92	0,85	0,66	0,41	0,54	0,34	0,44	0,78	0,39	0,71	0,53	1,32	0,69	0,75	1,13	1,40	1,50	0,81	0,79	tkt	
Glycolate pathway																							
slr0404	1,22	1,05	0,99	1,06	0,90	0,93	0,95	1,00	0,89	1,07	0,37	1,07	1,17	1,06	0,89	1,27	1,12	0,98	0,95	0,91	1,02	glcD	
slr1831	1,07	0,86	1,00	1,03	0,83	0,85	0,96	0,73	1,05	0,96	0,30	0,65	0,70	0,80	0,85	0,92	1,13	0,88	1,06	1,10	0,88	glcF	
TCA cycle																							
slr0823	1,10	0,84	0,83	0,72	0,57	0,54	0,54	0,46	0,71	0,98	0,76	0,26	0,92	0,96	1,36	0,91	0,87	1,74	1,25	0,94	0,85	sdhB	
slr1289	1,08	0,92	0,93	0,75	0,57	0,64	0,59	0,31	0,65	0,86	0,11	0,37	0,74	1,32	0,84	2,31	1,74	0,76	0,90	0,66	0,82	icd	
slr0891 <sup>+</sup>	0,72	0,98	1,03	1,11	1,35	1,18	1,23	1,38	1,34	1,05	2,58	1,77	1,24	0,86	1,08	0,88	0,70	1,12	1,22	1,07	0,80	mdh	
slr0892 <sup>+</sup>	0,87	1,11	1,12	1,10	1,51	1,34	1,35	1,46	1,50	1,00	2,29	1,30	1,81	0,93	1,44	0,69	0,42	1,27	1,33		2,64	panD	
ssl1690 <sup>+</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	3,15	2,93	1,30	0,89	0,94	1,09	0,56	0,96	0,96	1,36	0,51	ho	
Sugars																							
slr0493	0,94	1,00	1,26	1,40	2,02	1,91	1,79	1,69	1,86	1,83	0,76	0,92	1,31	1,08	0,67	0,91	1,00	0,72	0,99	0,74	1,78	manC like	
slr1448	1,12	1,24	1,41	1,28	2,06	1,94	2,16	2,80	1,90	1,40	0,77	1,21	1,26	0,92	0,95	0,88	0,76	0,89	1,04	0,84	1,14	kdgK	
slr0193 <sup>h</sup>	1,13	0,88	0,99	1,07	0,52	0,39	0,34	0,38	0,36	0,89	1,58	1,59	1,09	0,93	1,08	0,74	0,84	1,35	1,01	0,82	0,61	rbp3	

slr1688	1,05	<b>3,56</b>	0,59	1,38	<b>2,07</b>	<b>2,47</b>	<b>2,01</b>	<b>2,58</b>	<b>1,91</b>	1,05		0,62	<b>9,25</b>	1,68	0,96	1,06	<b>0,44</b>	<b>0,37</b>	<b>2,88</b>	<b>3,16</b>	1,19	<b>3,20</b>	thrC
slr0186	0,82	1,11	1,05	1,26	1,52	1,31	1,41	1,55	1,65	1,19		1,87	<b>3,36</b>	1,20	0,98	1,30	1,00	0,87	1,18	1,26	0,84	1,16	leuA

Strain and treatment	WT : Cd WT : SC										1738:Cd WT : Cd	WT : H2O2 WT : SC					WT : Fe- WT : SC		WT : Fe+ WT : SC		WT : Zn+ WT : SC		Gene name
Time or C	15'	30'	60'	75'	90'	180'	300'	300b'	360'	960'	180'	15'	30'	180'	300'	420'	1-0	2-0	240'	360'	30'	240'	
F: NITROGEN TRANSPORT AND ASSIMILATION																							
Nitrogen transport																							
slr10108	0,64	0,84	0,85	0,76	0,86	0,34	0,18	0,07	0,21	0,92	3,32	0,17	0,09	0,31	0,94	0,85	27,05	3,42	0,07	0,17	0,59	0,53	amt1
slr10107	0,57	1,06	1,09	1,06	0,83	0,54	0,57	0,13	0,56	0,71		0,10	0,17	0,57	1,14	1,36	5,40	3,68	0,44	0,36	0,74	0,71	amt2
slr1450 <sup>a</sup>	0,94	1,50	1,79	1,10	1,03	0,47	0,19	0,07	0,14	1,04		0,04	0,05	0,29	0,98	0,40	15,98	17,08	0,08	0,08	0,79	1,23	nrtA
slr1451 <sup>a</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,07	NS	NS		0,10	0,06	0,34	0,64	0,60	12,75	8,87	0,14	0,11	1,14	0,83	nrtB
slr1452 <sup>a</sup>	0,84	1,89	1,63	0,94	0,78	0,38	0,08	0,09	0,07	1,04		0,07	0,06	0,30	0,57	0,52	4,78	2,51	0,10	0,10	0,98	0,61	nrtC
slr1453 <sup>a</sup>	0,79	1,58	1,64	0,97	0,78	0,33	0,11	0,08	0,08	1,09		0,04	0,06	0,34	0,54	0,52	3,91	2,45	0,13	0,14	0,92		nrtD
slr0447	0,58	0,73	0,78	0,62	0,42	0,22	0,07	0,08	0,06	0,88	2,57	0,24	0,04	0,72	0,75	0,86	7,72	7,33	0,36	0,56	0,84	0,79	urtA
slr1200 <sup>b</sup>	0,84	0,98	0,90	0,62	0,51	0,22	0,24	0,12	0,24	0,65	2,46	0,03	0,07	0,49	0,98	0,90	9,32	6,02	0,42	0,41	0,88	1,04	urtB
slr1201 <sup>b</sup>	0,83	0,99	0,97	0,65	0,52	0,41	0,35	0,31	0,34	0,77		0,08	0,16	0,56	0,89	1,18	7,17	3,80	0,35	0,42	0,92	0,75	urtC
slr0374	0,92	0,79	0,92	0,97	0,91	0,91	1,06	0,85	1,21	1,01		0,60	0,50	0,97	0,84	0,91	1,22	1,50	0,91	1,14	1,55		urtE
slr0764	0,84	1,06	1,01	0,97	0,98	1,00	1,13	0,94	1,27	1,01		0,55	0,98	2,46	1,94	1,97	2,19	0,94	0,80	0,76	0,76	1,21	urtD
slr1270	1,02	0,71	0,70	0,75	0,55	0,46	0,32	0,23	0,33	0,66	1,98	0,04	0,36	0,47	0,66	0,63	4,82	2,60	0,58	0,71	0,79	0,76	bgtB
Glutamate family / Nitrogen assimilation																							
slr1746	0,64	0,57	0,72	0,58	0,69	0,60	0,29	0,26	0,38	0,83		0,45	0,37	0,68	0,89	0,66	1,60	1,96	0,50	1,09	0,87	1,42	murI
slr1898	0,85	0,86	0,88	0,94	0,75	0,63	0,54	0,52	0,50	0,77		0,20	0,24	0,65	0,84	0,80	1,81	1,37	0,59	0,81	1,05	0,98	argB
slr1454 <sup>a</sup>	0,71	1,54	1,96	1,05	1,10	0,46	0,17	0,10	0,16	1,59		0,07	0,09	0,44	0,88	0,63	12,79	7,30	0,17	0,17	1,25	0,94	narB
slr0898 <sup>c</sup>	0,95	1,40	1,20	0,81	0,47	0,26	0,11	0,08	0,10	0,75		0,04	0,13	0,37	0,95	0,90	22,75	21,93	0,12	0,08	1,22	1,41	nirA
slr0899 <sup>c</sup>	1,00	1,40	1,20	0,78	0,38	0,24	0,10	0,07	0,09	0,99		0,09	0,15	0,33	0,94	0,63	20,02	9,28	0,18	0,18	1,06	0,54	cynS
slr0900 <sup>c</sup>	1,04	1,25	1,30	0,80	0,48	0,34	0,18	0,14	0,22	0,92		0,04	0,20	0,44	1,01	0,72	9,23	2,08	0,27	0,31	0,91	0,61	moaA
slr0901 <sup>c</sup>	0,86	1,12	1,60	1,01	0,82	0,47	0,26	0,24	0,34	0,98		0,06	0,07	0,55	1,12	1,13	7,43	4,54	0,39	0,40		1,54	moaA
slr0902 <sup>c</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,33	NS	NS		0,14	0,51	0,66	1,05	0,90	2,55	2,09	0,41	0,57	0,85	1,09	moaC
ssr152 <sup>c</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,18	NS	NS		0,15	0,35	1,26	0,79		4,09	3,31	6,30	0,58	0,87		moaD
slr0903 <sup>c</sup>	0,56	1,08	1,79	0,97	1,20	0,62	0,46	0,35		1,10		0,36	0,72	0,85	0,79	0,90	2,09	1,60	0,73	0,61		1,13	moaE
slr0288	0,62	0,97	1,16	0,73	0,46	0,25	0,16	NS	0,14	0,69		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	glnN
slr1756	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,15	NS	NS	2,39	0,09	0,05	0,55	0,85	0,72	15,32	14,92	0,39	0,43	1,19	0,77	glnA
slr2001	1,01	0,89	0,70	0,77	0,41	0,50	0,57	0,41	0,56	0,76		0,50	0,64	0,70	1,02	1,03	1,41	1,41	1,00	1,04	0,97	1,04	cphB
slr2002	1,08	1,06	1,00	0,91	0,67	0,53	0,51	0,29	0,54	0,86		0,15	0,51	0,59	1,45	0,88	2,37	1,77	0,70	0,86	0,69	0,95	cphA
slr1515	0,82	0,81	1,02	1,80	1,95	4,03	6,81	6,73	10,61	1,02	0,49	52,08	62,60	5,82	1,82	2,88	0,13	0,14	4,66	5,13	0,52	2,98	gltB
ssr1911	1,69	1,07	0,93	1,79	3,14	5,97	13,07	24,72	8,98	1,20	0,43	20,03	117,62	6,85	3,56	4,47	0,02	0,05	10,06	9,29	0,41	1,65	gltA
slr1499	1,16	1,03	0,97	0,92	0,74	0,68	0,74	0,72	0,94	0,94		0,38	1,71	0,88	0,95	1,07	0,96	0,99	1,03	0,91	0,87	0,89	gltF
slr2079	1,22	1,25	0,98	0,99	0,83	1,34	1,26		1,31	1,41		0,49	0,66	0,66	0,93	0,69	0,94	0,97	1,06	1,26	0,87	0,96	gltA like
slr0585	0,79	0,93	1,10	0,96	0,85	0,79	0,72	0,58	0,68	0,90		0,11	0,20	0,59	0,84	0,74	1,29	1,52	0,85	1,17	0,84	1,21	argG
slr0373	1,05	0,94	1,07	1,06	1,18	1,37	1,37	1,71	1,43	1,19		0,50	0,25	0,91	0,84	0,85	0,82	1,08	1,22	1,10	1,07	1,20	proA
slr1133	0,96	0,82	0,83	0,94	0,60	0,64	0,71		0,76	0,84		0,69	0,42	0,75	0,90	1,18	1,33	1,31	1,05	0,93	1,07	0,53	argH
slr1256	0,93	1,08	0,90	0,97	1,20	1,27	1,49	1,48	1,46	1,22		0,43	0,80	0,85	0,93	0,56	1,03	1,09	0,72	0,91	0,78	1,28	ureA
slr1899	0,97	0,96	0,95	1,06	1,36	1,24	1,26	1,12	1,30	1,02		0,32	0,49	1,07	1,59	0,88	1,36	1,14	0,89	1,10	0,70	1,34	ureF
slr0710	1,22	0,93	0,96	1,08	0,79	0,69	0,71	0,86	0,73	0,95		1,69	2,55	0,74	0,89	0,66	0,58	0,71	1,12	1,48	0,55	0,27	gdhA
slr0100	0,95	1,04	0,99	1,12	1,04	1,35	1,29		1,23	1,17		2,59	2,15	1,29	0,74	1,54	0,94	1,02	0,91	1,11			hipO
slr0387	1,06	1,15	1,12	1,04	1,18	1,42	1,32		1,68	1,25		1,64	2,44	1,18	0,74	1,06	0,95	0,67	0,88	0,94	0,98		nifS
Amino acids and amines																							
slr1498	1,07	0,93	1,06	0,97	1,13	1,10	0,99	1,13	1,16	1,23		0,34	0,46	0,73	0,96	0,81	1,13	1,29	1,08	1,11	0,85	1,57	carA
slr0370	1,06	0,75	0,77	0,81	0,59	0,59	0,69	0,47	0,72	0,88		0,37	0,70	0,71	0,89	0,92	1,31	1,26	0,82	1,18	0,82	0,97	carB
slr0573	0,83	1,08	1,09	1,07	1,13	1,30	1,37		1,37	1,18		6,70	1,79	1,34	1,06	1,27	0,78	0,46	1,14	0,95	1,26	0,47	arcC
slr0227 <sup>d</sup>	1,07	1,08	1,38	1,22	1,13	1,17	1,58	1,64	1,12	1,28		1,74	0,85	1,00	0,74	1,39	0,54	0,69	1,79	1,40	0,79	1,10	ppiB
slr0228 <sup>d</sup>	1,13	1,14	1,04	0,90	1,03	1,35	1,65	1,59	1,44	1,20		2,14	0,77	0,85	0,84	0,89	0,60	0,87	1,30	1,09	1,12	1,01	speB1
slr1077 <sup>e</sup>	0,65	2,43	1,98	1,06	0,99	0,34	0,40	0,26	0,57	1,20	2,94	0,22	0,26	0,23	1,19	1,81	1,43	1,42	0,44	0,54	1,32	0,61	speB2
slr1078 <sup>e</sup>	0,45	2,07	1,70	0,84	0,59	0,21	0,22	0,23	0,22	1,39		0,41	0,15	0,24	1,40	1,86	1,31	1,11	0,25	0,37	1,61	0,49	hypA2
slr1079 <sup>e</sup>	0,61	2,35	2,35	1,08	0,90	0,26	0,29	0,23	0,28	1,33		0,56	0,15	0,35	1,27	1,50	1,18	1,19	0,34	0,38	1,62	0,55	hypB
slr0293	1,11	1,13	1,00	1,09	1,12	1,40	1,19	1,49	1,27	1,13		0,22	1,17	1,49	0,94	1,00	0,70	0,72	0,91	0,92	0,85	4,50	gcvP
slr0229	1,37	1,15		0,60	1,76	1,31		1,33	2,10	1,04		1,74	1,94	0,97	0,84	1,00	0,77	0,66	1,49	0,79	1,30	1,61	mmsB
slr1705	1,20	1,05	0,98	1,30	1,50	1,68	1,85	1,87	2,06	1,04		2,98	2,89	2,11	1,24	1,29	0,74	0,57	1,51	1,46	0,70	2,93	aspA
slr0422	0,88	0,94	0,94	0,79	0,54	0,66	0,74		0,82	0,85		3,72	2,47	1,93	0,97	1,31	0,88	1,24	1,03	0,85	1,25	0,73	ybiK
slr0090	1,24	1,00	1,13	1,44	1,72	1,64	1,36		1,29	1,27		0,20	0,41	1,62	1,05	1,55	1,03	1,15	1,29	1,04	1,15	3,91	ppd
slr0938	0,96	1,05	1,04	0,73	1,13	1,24	1,68	1,67	2,17	1,09		1,15	1,40	1,86	1,01	1,28	0,85	0,71	1,09	0,96	1,44	1,55	MurE
slr1234	0,87	1,03	1,11	1,03	1,39	1,32	1,41	1,47	1,05	1,04		0,57	0,57	0,89	0,70	0,73	1,04	1,19	0,77	0,76	0,81	2,94	ahcY

respectively. For the Fe starvation stress, the switch in Fe concentration ( $C$  in  $\mu\text{M}$ , written in italics) of the depleted media is indicated as *1-0* (standing for 1 then 0  $\mu\text{M}$ ) or *2-0* (standing for 2 then 0  $\mu\text{M}$ ). The time point 300 min of the kinetic of Cd responses was repeated twice (columns 300' and 300b') with the two different versions of the Cyanochip DNA microarrays (Methods), leading to very reproducible results. Genes were considered differentially regulated whenever their level of expression was changed at least 1.9 fold. The corresponding figures were highlighted by bold and grey boxes in case of upregulation and downregulation, respectively.

For the sake of clarity the regulated genes, represented by their Cyanobase (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>) identifier (extreme left column) and names (extreme right column) were sorted according to the pathway they operate in (see Cyanobase; KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) and MBGD (<http://mbgd.genome.ad.jp>)). Genes encoding hypothetical and unknown proteins were represented as “ho” and “unk”, respectively. Every gene member of the same operon or cluster is designated with the same lower case superscript letter juxtaposed to the gene identifier.

## REFERENCES

- Aboulmagd, E., Oppermann-Sanio, F.B., and Steinbuchel, A.** (2001). Purification of *Synechocystis* sp. strain PCC6308 cyanophycin synthetase and its characterization with respect to substrate and primer specificity. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2176-2182.
- Andrew, A.S., Warren, A.J., Barchowsky, A., Temple, K.A., Klei, L., Soucy, N.V., O'Hara, K.A., and Hamilton, J.W.** (2003). Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ Health Perspect* **111**, 825-835.
- Badger, M.R., and Price, G.D.** (2003). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot* **54**, 609-622.
- Benov, L., and Fridovich, I.** (1998). Growth in iron-enriched medium partially compensates *Escherichia coli* for the lack of manganese and iron superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **273**, 10313-10316.
- Bryant, D.A.** (1994). *The molecular biology of cyanobacteria.* (Dordrecht: Kluwer academic publishers).
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J.D.** (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and

peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.* **29**, 189-198.

**Cavet, J.S., Borrelly, G.P., and Robinson, N.J.** (2003). Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 165-181.

**Djaman, O., Outten, F.W., and Imlay, J.A.** (2004). Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 44590-44599.

**Domain, F., Houot, L., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C.** (2004). Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* **53**, 65-80.

**Dorman, C.J., and Deighan, P.** (2003). Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 179-184.

**Duran, R.V., Hervas, M., De La Rosa, M.A., and Navarro, J.A.** (2004). The efficient functioning of photosynthesis and respiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803 strictly requires the presence of either cytochrome *c6* or plastocyanin. *J. Biol. Chem.* **279**, 7229-7233.

**Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J.C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M., and Labarre, J.** (2002). Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* **9**, 713-723.

**Ferris, M.J., and Palenik, B.** (1998). Niche adaptation in ocean cyanobacteria. *Nature* **396**, 226 - 228.

**Figge, R.M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., and Cerff, R.** (2001). Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **39**, 455-469.

**Garcia-Dominguez, M., Reyes, J.C., and Florencio, F.J.** (2000a). NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* **35**, 1192-1201.

**Garcia-Dominguez, M., Lopez-Maury, L., Florencio, F.J., and Reyes, J.C.** (2000b). A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **182**, 1507-1514.

**Gray, M.W.** (1993). Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 884-890.

**He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O., and Grossman, A.R.** (2001). The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803. Expression and function in high light. *J. Biol. Chem.* **276**, 306-314.



- Hosoya-Matsuda, N., Motohashi, K., Yoshimura, H., Nozaki, A., Inoue, K., Ohmori, M., and Hisabori, T.** (2005). Anti-oxidative stress system in cyanobacteria. Significance of type II peroxiredoxin and the role of 1-Cys peroxiredoxin in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **280**, 840-846.
- Howitt, C.A., Udall, P.K., and Vermaas, W.F.** (1999). Type 2 NADH dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. *J Bacteriol* **181**, 3994-4003.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S.** (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Katoh, H., Hagino, N., Grossman, A.R., and Ogawa, T.** (2001). Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **183**, 2779-2784.
- Kobayashi, M., Ishizuka, T., Katayama, M., Kanehisa, M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H.B., and Ikeuchi, M.** (2004). Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **45**, 290-299.
- Koksharova, O., Schubert, M., Shestakov, S., and Cerff, R.** (1998). Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* **36**, 183-194.
- Labarre, J., Chauvat, F., and Thuriaux, P.** (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *J. Bacteriol.* **171**, 3449-3457.
- Li, H., Singh, A.K., McIntyre, L.M., and Sherman, L.A.** (2004). Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **186**, 3331-3345.
- Li, R., Haile, J.D., and Kennelly, P.J.** (2003). An arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics. *J Bacteriol* **185**, 6780-6789.

- Lopez-Maury, L., Florencio, F.J., and Reyes, J.C.** (2003). Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **185**, 5363-5371.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., and Penny, D.** (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12246-12251.
- Mazouni, K., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F.** (1998). Promoter element spacing controls basal expression and light-inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol. Microbiol.* **30**, 1113-1122.
- Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C.** (2003). Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* **49**, 1019-1029.
- Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F.** (2004). Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* **52**, 1145-1158.
- Mrazek, J., Bhaya, D., Grossman, A.R., and Karlin, S.** (2001). Highly expressed and alien genes of the *Synechocystis* genome. *Nucleic Acids Res* **29**, 1590-1601.
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T.** (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**, 579-582.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S.I., Inaba, M., Yokota, A., and Murata, N.** (2001). Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J.* **20**, 5587-5594.
- Partensky, F., Hess, W.R., and Vaulot, D.** (1999). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 106-127.
- Poncelet, M., Cassier-Chauvat, C., Leschelle, X., Bottin, H., and Chauvat, F.** (1998). Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Mol. Microbiol* **28**, 813-821.
- Raux, E., Lanois, A., Warren, M.J., Rambach, A., and Thermes, C.** (1998). Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* cobI operon. *Biochem J* **335** ( Pt 1), 159-166.



- Rensing, C., Ghosh, M., and Rosen, B.P.** (1999). Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* **181**, 5891-5897.
- Rosenzweig, A.C.** (2002). Metallochaperones: bind and deliver. *Chem Biol* **9**, 673-677.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E., Williams, D.J., and Moore, M.R.** (2003). A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett* **137**, 65-83.
- Schneider, D., Berry, S., Volkmer, T., Seidler, A., and Rogner, M.** (2004). PetC1 is the major Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome b6f complex of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **279**, 39383-39388.
- Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C.W., Robinson, C., Mann, N.H., and Nixon, P.J.** (2003). FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* **15**, 2152-2164.
- Singh, A.K., McIntyre, L.M., and Sherman, L.A.** (2003). Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **132**, 1825-1839.
- Stohs, S.J., and Bagchi, D.** (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**, 321-336.
- Straus, N.A.** (1994). Iron deprivation: Physiology and Gene Regulation. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, D.A. Bryant, ed (Dordrecht: Kluwer Academic Publisher), pp. 731-750.
- Thelwell, C., Robinson, N.J., and Turner-Cavet, J.S.** (1998). An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10728-10733.
- Toledano, M.B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F.** (2004). Microbial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* **29**, 351-357.
- van Waasbergen, L.G., Dolganov, N., and Grossman, A.R.** (2002). nblS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **184**, 2481-2490.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D.** (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**, 95-117.
- Wang, T., Shen, G., Balasubramanian, R., McIntosh, L., Bryant, D.A., and Golbeck, J.H.** (2004). The sufR gene (sll0088 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803) functions as a repressor of the sufBCDS operon in iron-sulfur cluster biogenesis in cyanobacteria. *J Bacteriol* **186**, 956-967.

- Yeremenko, N., Kouril, R., Ihalainen, J.A., D'Haene, S., van Oosterwijk, N., Andrizhiyevskaya, E.G., Keegstra, W., Dekker, H.L., Hagemann, M., Boekema, E.J., Matthijs, H.C., and Dekker, J.P.** (2004). Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria. *Biochemistry* **43**, 10308-10313.
- Zehr, J.P., Waterbury, J.B., Turner, P.J., Montoya, J.P., Omoregie, E., Steward, G.F., Hansen, A., and Karl, D.M.** (2001). Unicellular cyanobacteria fix N<sub>2</sub> in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* **412**, 635-638.
- Zhang, P., Battchikova, N., Jansen, T., Appel, J., Ogawa, T., and Aro, E.M.** (2004). Expression and Functional Roles of the Two Distinct NDH-1 Complexes and the Carbon Acquisition Complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* **16**, 3326-3340.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G.** (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**, 4562-4570.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Rouhier, N., E. Gelhaye, and J.P. Jacquot, *Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(11): p. 1266-77.
2. Awramik, S.M., *The oldest records of photosynthesis*. Photosynth Res, 1992. **33**: p. 75-89.
3. Schopf, J.W., *Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life*. Science, 1993. **260**: p. 640-6.
4. Schopf, J.W., *Solution to Darwin's dilemma: discovery of the missing Precambrian record of life*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 6947-53.
5. Des Marais, D.J., *Microbial mats, stromatolites and the rise of oxygen in the Precambrian atmosphere*. Glob Planet Change, 1991. **97**: p. 93-6.
6. Partensky, F., W.R. Hess, and D. Vaulot, *Prochlorococcus, a marine photosynthetic prokaryote of global significance*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(1): p. 106-27.
7. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., and Stanier, R., *Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. J. Gen. Microbiol., 1979. **111**: p. 1-61.
8. Garcia-Pichel, F. and O. Pringault, *Microbiology. Cyanobacteria track water in desert soils*. Nature, 2001. **413**(6854): p. 380-1.
9. Collier, J.L. and A.R. Grossman, *A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria*. Embo J, 1994. **13**(5): p. 1039-47.
10. Labarre, J., P. Thuriaux, and F. Chauvat, *Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium Synechocystis sp. strain 6803*. J Bacteriol, 1987. **169**(10): p. 4668-73.
11. Flores, E. and A. Herrero, *Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 1): p. 164-7.
12. Smart, L.B., S.L. Anderson, and L. McIntosh, *Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. Embo J, 1991. **10**(11): p. 3289-96.
13. Pelroy, R.A., R. Rippka, and R.Y. Stanier, *Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae*. Arch Mikrobiol, 1972. **87**(4): p. 303-22.

14. Rochaix, J.D., *Genetic analysis of photosynthesis in prokaryotes and lower eukaryotes*. Curr Opin Genet Dev, 1992. **2**(5): p. 785-91.
15. Debus, R.J., et al., *Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 427-30.
16. Dzelzkalns, V.A. and L. Bogorad, *Molecular analysis of a mutant defective in photosynthetic oxygen evolution and isolation of a complementing clone by a novel screening procedure*. Embo J, 1988. **7**(2): p. 333-8.
17. Martin, W., et al., *Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12246-51.
18. Kaneko, T., et al., *Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions*. DNA Res, 1996. **3**(3): p. 109-36.
19. Domain, F., et al., *Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation*. Mol Microbiol, 2004. **53**(1): p. 65-80.
20. Labarre, J., F. Chauvat, and P. Thuriaux, *Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium Synechocystis strain PCC 6803*. J Bacteriol, 1989. **171**(6): p. 3449-57.
21. Shestakov, S.V. and N.T. Khyen, *Evidence for genetic transformation in blue-green alga Anacystis nidulans*. Mol Gen Genet, 1970. **107**(4): p. 372-5.
22. Williams, J.G.K., *Construction of specific mutation in the photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in Synechocystis PCC 6803*. Methods Enzymol, 1988. **167**: p. 766-778.
23. Marraccini, P., et al., *A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera Synechococcus and Synechocystis*. Plant Mol Biol, 1993. **23**(4): p. 905-9.
24. Poncelet, M., et al., *Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in Synechocystis PCC6803 by plasmid shuffling*. Mol Microbiol, 1998. **28**(4): p. 813-21.
25. Mermet-Bouvier, P. and F. Chauvat, *A conditional expression vector for the cyanobacteria Synechocystis sp. strains PCC6803 and PCC6714 or Synechococcus sp. strains PCC7942 and PCC6301*. Curr Microbiol, 1994. **28**(3): p. 145-8.
26. Mazouni, K., et al., *Molecular analysis of the key cytokinetic components of*

*cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE*. Mol Microbiol, 2004. **52**(4): p. 1145-58.

27. Mazouni, K., et al., *Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria*. Mol Microbiol, 2003. **49**(4): p. 1019-29.
28. Sticht, H. and P. Rosch, *The structure of iron-sulfur proteins*. Prog Biophys Mol Biol, 1998. **70**(2): p. 95-136.
29. Beinert, H. and P.J. Kiley, *Fe-S proteins in sensing and regulatory functions*. Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**(2): p. 152-7.
30. Dai, S., et al., *Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster*. Science, 2000. **287**(5453): p. 655-8.
31. Mortenson, L.E., R.C. Valentine, and J.E. Carnahan, *An electron transport factor from Clostridium pasteurianum*. Biochem Biophys Res Commun, 1962. **7**: p. 448-52.
32. Cosmatos, A. and P.G. Katsoyannis, *Elongation of the interchain disulfide bridges of insulin. A synthetic analog*. J Biol Chem, 1975. **250**(14): p. 5315-21.
33. Lillig, C.H., et al., *Redox regulation of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase from Escherichia coli by glutathione and glutaredoxins*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22325-30.
34. Kortemme, T. and T.E. Creighton, *Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family*. J Mol Biol, 1995. **253**(5): p. 799-812.
35. Martin, J.L., *Thioredoxin--a fold for all reasons*. Structure, 1995. **3**(3): p. 245-50.
36. Holmgren, A., *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 13963-6.
37. Fomenko, D.E. and V.N. Gladyshev, *CxxS: fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function*. Protein Sci, 2002. **11**(10): p. 2285-96.
38. Fetrow, J.S., et al., *Genomic-scale comparison of sequence- and structure-based methods of function prediction: does structure provide additional insight?* Protein Sci, 2001. **10**(5): p. 1005-14.
39. Bryant, D., *The molecular biology of Cyanobacteria*.
40. Golbeck, J.H., *Structure and function of the photosystem I*. Am Rev Plant Physiol, 1992. **42**: p. 293-324.

41. Barry, B.A., Boerner, R.J., and de Paula, J.C., *The Molecular Biology of Cyanobacteria. The use of cyanobacteria in the study of the structure and function of photosystem II*. 1994.
42. Richaud, C., et al., *Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the nblA gene in Synechocystis strain PCC 6803*. J Bacteriol, 2001. **183**(10): p. 2989-94.
43. Frank, H.A., and Brudvig, G.W., *Redox functions of carotenoids in photosynthesis*. Biochemistry, 2004. **43**: p. 8607-8615.
44. Demmig-Adams, B. and W.W. Adams, 3rd, *Antioxidants in photosynthesis and human nutrition*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2149-53.
45. Boekema, E.J., et al., *Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 175-9.
46. Kashino, Y., et al., *Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides*. Biochemistry, 2002. **41**(25): p. 8004-12.
47. Shi, L.X. and W.P. Schroder, *The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1608**(2-3): p. 75-96.
48. Diner, B.A. and F. Rappaport, *Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis*. Annu Rev Plant Biol, 2002. **53**: p. 551-80.
49. De Las Rivas, J., Shipton, C.A., Ponticos, M., and Barber, J., *Acceptor side mechanism of photoinduced proteolysis of the D1 protein in photosystem II reaction centers*. Biochemistry, 1993. **32**: p. 6944-6950.
50. Shen, J.R., R.L. Burnap, and Y. Inoue, *An independent role of cytochrome c-550 in cyanobacterial photosystem II as revealed by double-deletion mutagenesis of the psbO and psbV genes in Synechocystis sp. PCC 6803*. Biochemistry, 1995. **34**(39): p. 12661-8.
51. Schmetterer, *The Molecular Biology of Cyanobacteria. Cyanobacterial respiration*. 1994.
52. Schneider, D., et al., *PetCI is the major Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome b6f complex of Synechocystis sp. PCC 6803*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39383-8.
53. Duran, R.V., et al., *The efficient functioning of photosynthesis and respiration in Synechocystis sp. PCC 6803 strictly requires the presence of either cytochrome c6 or plastocyanin*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7229-33.



54. Frasch, W.D., *The Molecular Biology of Cyanobacteria. The F-type ATPase in cyanobacteria: pivotal point in the evolution of a universal enzyme*. 1994.
55. Munekage, Y., et al., *Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis*. Nature, 2004. **429**(6991): p. 579-82.
56. Yeremenko, N., et al., *Open Reading Frame ssr2016 is Required for Antimycin A-sensitive Photosystem I-driven Cyclic Electron Flow in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. Plant Cell Physiol, 2005. **46**(8): p. 1433-6.
57. Elrad, D., K.K. Niyogi, and A.R. Grossman, *A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation*. Plant Cell, 2002. **14**(8): p. 1801-16.
58. Boekema, E.J., et al., *A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria*. Nature, 2001. **412**(6848): p. 745-8.
59. Cadoret, J.C., et al., *Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43' (isiA)*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1659**(1): p. 100-4.
60. Flores, E., and Herrero, A., *The Molecular Biology of Cyanobacteria. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation*. 1994.
61. Tabita, F.R., *The Molecular Biology of Cyanobacteria. The biochemistry and molecular regulation of carbon dioxide metabolism in cyanobacteria*. 1994.
62. Badger, M.R. and G.D. Price, *CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution*. J Exp Bot, 2003. **54**(383): p. 609-22.
63. Wang, H. and G. Oster, *Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase*. Nature, 1998. **396**(6708): p. 279-82.
64. Fridovich, I., *The biology of oxygen radicals*. Science, 1978. **201**(4359): p. 875-80.
65. Fernandes, A.P. and A. Holmgren, *Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(1): p. 63-74.
66. Grant, C.M., *Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions*. Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 533-41.
67. Yamawaki, H., J. Haendeler, and B.C. Berk, *Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1029-33.
68. Draculic, T., I.W. Dawes, and C.M. Grant, *A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 2000.

36(5): p. 1167-74.

69. Williams, C.H., et al., *Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6110-7.
70. Williams, C.H., Jr., *Thioredoxin-thioredoxin reductase--a system that has come of age*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6101.
71. Laloi, C., et al., *Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14144-9.
72. Dai, S., et al., *Crystal structure of Arabidopsis thaliana NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution*. J Mol Biol, 1996. **264**(5): p. 1044-57.
73. Gladyshev, V.N., K.T. Jeang, and T.C. Stadtman, *Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 6146-51.
74. Holmgren, A., *Thioredoxin*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 237-71.
75. Holmgren, A. and M. Bjornstedt, *Thioredoxin and thioredoxin reductase*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 199-208.
76. Lemaire, S.D., et al., *Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett, 2003. **543**(1-3): p. 87-92.
77. Mestres-Ortega, D. and Y. Meyer, *The Arabidopsis thaliana genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin*. Gene, 1999. **240**(2): p. 307-16.
78. Florencio, F.J., et al., *An NADP/thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach*. Arch Biochem Biophys, 1988. **266**(2): p. 496-507.
79. Mittard, V., et al., *NMR solution structure of an oxidised thioredoxin h from the eukaryotic green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Eur J Biochem, 1997. **243**(1-2): p. 374-83.
80. Gelhaye, E., N. Rouhier, and J.P. Jacquot, *The thioredoxin h system of higher plants*. Plant Physiol Biochem, 2004. **42**(4): p. 265-71.
81. Deonarain, M.P., et al., *Alternative proton donors/acceptors in the catalytic mechanism of the glutathione reductase of Escherichia coli: the role of histidine-439 and tyrosine-99*. Biochemistry, 1989. **28**(25): p. 9602-7.



82. Kunert, K.J., et al., *Variations in the activity of glutathione reductase and the cellular glutathione content in relation to sensitivity to methylviologen in Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys, 1990. **282**(2): p. 233-8.
83. Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura, *Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1995. **368**(1): p. 73-6.
84. Grant, C.M., F.H. MacIver, and I.W. Dawes, *Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 1996. **29**(6): p. 511-5.
85. Penninckx, M., *A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses*. Enzyme Microb Technol, 2000. **26**(9-10): p. 737-742.
86. Grant, C.M., et al., *Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation*. Mol Microbiol, 1996. **21**(1): p. 171-9.
87. Spector, D., J. Labarre, and M.B. Toledano, *A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7011-6.
88. Greenberg, J.T. and B. Demple, *Glutathione in Escherichia coli is dispensable for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma radiation*. J Bacteriol, 1986. **168**(2): p. 1026-9.
89. Tuggle, C.K. and J.A. Fuchs, *Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1985. **162**(1): p. 448-50.
90. Muller, E.G., *A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(11): p. 1805-13.
91. Holmgren, A., *Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2275-9.
92. Laurent, T.C., E.C. Moore, and P. Reichard, *Enzymatic Synthesis Of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation And Characterization Of Thioredoxin, The Hydrogen Donor From Escherichia Coli B*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 3436-44.
93. Nordstrand, K., et al., *NMR structure of Escherichia coli glutaredoxin 3-glutathione mixed disulfide complex: implications for the enzymatic mechanism*. J Mol Biol, 1999. **286**(2): p. 541-52.

94. Aslund, F., K.D. Berndt, and A. Holmgren, *Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30780-6.
95. Ebel, T., et al., *Characterization of a secretory type Theileria parva glutaredoxin homologue identified by novel screening procedure*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 3042-8.
96. Tanaka, T., et al., *Redox regulation by thioredoxin superfamily; protection against oxidative stress and aging*. Free Radic Res, 2000. **33**(6): p. 851-5.
97. Jacquot, J.P., et al., *Arabidopsis thaliana NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli*. J Mol Biol, 1994. **235**(4): p. 1357-63.
98. Trotter, E.W. and C.M. Grant, *Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(2): p. 392-400.
99. Outten, C.E. and V.C. Culotta, *Alternative start sites in the Saccharomyces cerevisiae GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7785-91.
100. Pedrajas, J.R., et al., *Two isoforms of Saccharomyces cerevisiae glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments*. Biochem J, 2002. **364**(Pt 3): p. 617-23.
101. Johansson, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren, *Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7537-43.
102. Muller, S., *Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol, 2004. **53**(5): p. 1291-305.
103. Lundberg, M., et al., *Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26269-75.
104. Fernandes, A.P., et al., *A novel monothiol glutaredoxin (GRX4) from Escherichia coli can serve as a substrate for thioredoxin reductase*. J Biol Chem, 2005.
105. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.
106. Alger, H.M. and D.L. Williams, *The disulfide redox system of Schistosoma mansoni and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **121**(1): p. 129-39.

107. Rendon, J.L., et al., *Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from Taenia crassiceps metacestode (cysticerci)*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **133**(1): p. 61-9.
108. Bauer, H., et al., *Thioredoxin reductase from the malaria mosquito Anopheles gambiae*. Eur J Biochem, 2003. **270**(21): p. 4272-81.
109. Kanzok, S.M., et al., *Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in Drosophila melanogaster*. Science, 2001. **291**(5504): p. 643-6.
110. Kanzok, S.M., et al., *The thioredoxin system of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Glutathione reduction revisited*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40180-6.
111. Vlamis-Gardikas, A. and A. Holmgren, *Thioredoxin and glutaredoxin isoforms*. Methods Enzymol, 2002. **347**: p. 286-96.
112. Witte, S., et al., *Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain*. J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 1902-9.
113. Rahlfs, S., M. Fischer, and K. Becker, *Plasmodium falciparum possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37133-40.
114. Cheng, N.H. and K.D. Hirschi, *Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing Arabidopsis protein that associates with CAX1*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6503-9.
115. Lemaire, S.D., *The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms*. Photosynthesis Research, 2004. **79**: p. 305-318.
116. Xia, B., et al., *Solution structure of Escherichia coli glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases*. J Mol Biol, 2001. **310**(4): p. 907-18.
117. Buchanan, B.B. and Y. Balmer, *REDOX REGULATION: A Broadening Horizon*. Annu Rev Plant Biol, 2005. **56**: p. 187-220.
118. Eklund, H., et al., *Structure of oxidized bacteriophage T4 glutaredoxin (thioredoxin). Refinement of native and mutant proteins*. J Mol Biol, 1992. **228**(2): p. 596-618.
119. Ahn, B.Y. and B. Moss, *Glutaredoxin homolog encoded by vaccinia virus is a virion-associated enzyme with thioltransferase and dehydroascorbate reductase activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7060-4.
120. Davis, D.A., et al., *Thioltransferase (glutaredoxin) is detected within HIV-1 and can regulate the activity of glutathionylated HIV-1 protease in vitro*. J Biol Chem, 1997.

272(41): p. 25935-40.

121. Gan, Z.R., et al., *Yeast thioltransferase--the active site cysteines display differential reactivity*. Arch Biochem Biophys, 1990. **282**(1): p. 110-5.
122. Gan, Z.R., et al., *Complete amino acid sequence of yeast thioltransferase (glutaredoxin)*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(3): p. 944-51.
123. Hopper, S., et al., *Glutaredoxin from rabbit bone marrow. Purification, characterization, and amino acid sequence determined by tandem mass spectrometry*. J Biol Chem, 1989. **264**(34): p. 20438-47.
124. Padilla, C.A., et al., *Purification from placenta, amino acid sequence, structure comparisons and cDNA cloning of human glutaredoxin*. Eur J Biochem, 1995. **227**(1-2): p. 27-34.
125. Martinez-Galisteo, E., et al., *Characterization of mammalian thioredoxin reductase, thioredoxin and glutaredoxin by immunochemical methods*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995. **111**(1): p. 17-25.
126. Hoog, J.O., et al., *Cloning and expression of the glutaredoxin (grx) gene of Escherichia coli*. Gene, 1986. **43**(1-2): p. 13-21.
127. Minakuchi, K., et al., *Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rice glutaredoxin*. FEBS Lett, 1994. **337**(2): p. 157-60.
128. Morell, S., H. Follmann, and I. Haberlein, *Identification and localization of the first glutaredoxin in leaves of a higher plant*. FEBS Lett, 1995. **369**(2-3): p. 149-52.
129. Rouhier, N., et al., *Enhancement of poplar glutaredoxin expression by optimization of the cDNA sequence*. Protein Expr Purif, 2002. **24**(2): p. 234-41.
130. Xing, S., M.G. Rosso, and S. Zachgo, *ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in Arabidopsis thaliana*. Development, 2005. **132**(7): p. 1555-65.
131. Lemaire, S.D. and M. Miginiac-Maslow, *The thioredoxin superfamily in Chlamydomonas reinhardtii*. Photosynth Res, 2004. **82**(3): p. 203-20.
132. Rouhier, N., et al., *Characterization of the redox properties of poplar glutaredoxin*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(1): p. 15-22.
133. Bick, J.A., et al., *Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8404-9.
134. Sun, Q.A., et al., *Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and*

*glutathione systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 3673-8.

135. Su, D. and V.N. Gladyshev, *Alternative splicing involving the thioredoxin reductase module in mammals: a glutaredoxin-containing thioredoxin reductase 1*. Biochemistry, 2004. **43**(38): p. 12177-88.
136. Chae, H.Z., et al., *Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin*. Diabetes Res Clin Pract, 1999. **45**(2-3): p. 101-12.
137. Echalier, A., et al., *Crystal structure and solution NMR dynamics of a D (type II) peroxiredoxin glutaredoxin and thioredoxin dependent: a new insight into the peroxiredoxin oligomerism*. Biochemistry, 2005. **44**(6): p. 1755-67.
138. Tao, K., *oxyR-dependent induction of Escherichia coli grx gene expression by peroxide stress*. J Bacteriol, 1997. **179**(18): p. 5967-70.
139. Oden, K.L., T.B. Gladysheva, and B.P. Rosen, *Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione*. Mol Microbiol, 1994. **12**(2): p. 301-6.
140. Mukhopadhyay, R. and B.P. Rosen, *Saccharomyces cerevisiae ACR2 gene encodes an arsenate reductase*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **168**(1): p. 127-36.
141. Muhlenhoff, U., et al., *Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isulp*. Embo J, 2003. **22**(18): p. 4815-25.
142. Alves, R., E. Herrero, and A. Sorribas, *Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism. II. Role of glutaredoxin Grx5*. Proteins, 2004. **57**(3): p. 481-92.
143. Rodriguez-Manzaneque, M.T., et al., *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): p. 1109-21.
144. Achebach, S., et al., *Stimulation of Fe-S cluster insertion into apoFNR by Escherichia coli glutaredoxins 1, 2 and 3 in vitro*. FEBS Lett, 2004. **565**(1-3): p. 203-6.
145. Wingert, R.A., et al., *Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 1035-39.
146. Ghezzi, P., *Regulation of protein function by glutathionylation*. Free Radic Res, 2005. **39**(6): p. 573-80.
147. Kil, I.S. and J.W. Park, *Regulation of mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase activity by glutathionylation*. J Biol Chem, 2005.

148. Reddy, S., et al., *Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue*. Biochem J, 2000. **347 Pt 3**: p. 821-7.
149. Konorev, E.A., B. Kalyanaraman, and N. Hogg, *Modification of creatine kinase by S-nitrosothiols: S-nitrosation vs. S-thiolation*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(11): p. 1671-8.
150. Davis, D.A., et al., *Reversible oxidative modification as a mechanism for regulating retroviral protease dimerization and activation*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3319-25.
151. Chrestensen, C.A., D.W. Starke, and J.J. Mieyal, *Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (Glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26556-65.
152. Starke, D.W., P.B. Chock, and J.J. Mieyal, *Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14607-13.
153. Prieto-Alamo, M.J., et al., *Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13398-405.
154. Vido, K., et al., *A proteome analysis of the cadmium response in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8469-74.
155. Murata, H., et al., *Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50226-33.
156. Collin, V., et al., *The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23747-52.
157. Serrato, A.J., et al., *A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 43821-7.
158. Rudhe, C., et al., *Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts*. J Mol Biol, 2004. **343**(3): p. 639-47.
159. Buchanan, B.B. and S. Luan, *Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research*. J Exp Bot, 2005. **56**(416): p. 1439-47.
160. Nishida, M., et al., *G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 492-5.
161. Sawyer, D.B., et al., *Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure*. J



Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(4): p. 379-88.

162. Machida, Y., et al., *Overexpression of tumor necrosis factor-alpha increases production of hydroxyl radical in murine myocardium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H449-55.
163. Sabri, A., H.H. Hughie, and P.A. Lucchesi, *Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(6): p. 731-40.
164. Wu, H.M., K.H. Chi, and W.W. Lin, *Proteasome inhibitors stimulate activator protein-1 pathway via reactive oxygen species production*. FEBS Lett, 2002. **526**(1-3): p. 101-5.
165. Halliwell, B., *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. Free Radic Res, 1999. **31**(4): p. 261-72.
166. Davies, K.J., *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochem Soc Symp, 1995. **61**: p. 1-31.
167. Hensley, K., et al., *Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(10): p. 1456-62.
168. Turner, D.R., et al., *Mitotic recombination is an important mutational event following oxidative damage*. Mutat Res, 2003. **522**(1-2): p. 21-6.
169. Chaube, S.K., et al., *Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro*. Apoptosis, 2005. **10**(4): p. 863-74.
170. Huang, M.E. and R.D. Kolodner, *A biological network in Saccharomyces cerevisiae prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage*. Mol Cell, 2005. **17**(5): p. 709-20.
171. Erdmann, K., N. Grosser, and H. Schroder, *L-methionine reduces oxidant stress in endothelial cells: role of heme oxygenase-1, ferritin, and nitric oxide*. Aaps J, 2005. **7**(1): p. E195-200.
172. Joshi, S., et al., *Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide*. Hum Exp Toxicol, 2005. **24**(1): p. 13-7.
173. Bellomo, G., et al., *Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress. A study with isolated hepatocytes and menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone)*. Biochem Pharmacol, 1987. **36**(8): p. 1313-20.

174. Seres, T., et al., *Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress.* J Immunol, 1996. **156**(5): p. 1973-80.
175. Meischenguiser, R., C.H. D'Giano, and S.M. Ferraro, *Oxcarbazepine in pregnancy: clinical experience in Argentina.* Epilepsy Behav, 2004. **5**(2): p. 163-7.
176. Biteau, B., J. Labarre, and M.B. Toledano, *ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin.* Nature, 2003. **425**(6961): p. 980-4.
177. Tuma, D.J. and C.A. Casey, *Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts.* Alcohol Res Health, 2003. **27**(4): p. 285-90.
178. Davies, M.J., *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 761-70.
179. Winn, L.M., *Homologous recombination initiated by benzene metabolites: a potential role of oxidative stress.* Toxicol Sci, 2003. **72**(1): p. 143-9.
180. Calviello, G., et al., *DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism.* Toxicol Appl Pharmacol, 2005.
181. Gaber, A., et al., *NADPH-dependent glutathione peroxidase-like proteins (Gpx-1, Gpx-2) reduce unsaturated fatty acid hydroperoxides in *Synechocystis* PCC 6803.* FEBS Lett, 2001. **499**(1-2): p. 32-6.
182. Hosoya-Matsuda, N., et al., *Anti-oxidative stress system in cyanobacteria. Significance of type II peroxiredoxin and the role of I-Cys peroxiredoxin in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.* J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 840-6.
183. Gilbert, H.F., *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange.* Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1990. **63**: p. 69-172.
184. Nakao, L.S., et al., *Radical production from free and peptide-bound methionine sulfoxide oxidation by peroxynitrite and hydrogen peroxide/iron(II).* FEBS Lett, 2003. **547**(1-3): p. 87-91.
185. St John, G., et al., *Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9901-6.
186. Craft, E., et al., *Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects.* J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2004. **7**(4): p. 297-317.
187. Nascimento, A.M. and E. Chartone-Souza, *Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments.* Genet Mol



Res, 2003. **2**(1): p. 92-101.

188. Rosen, B.P., *Biochemistry of arsenic detoxification*. FEBS Lett, 2002. **529**(1): p. 86-92.
189. Satoh, M., et al., *Perspectives on cadmium toxicity research*. Tohoku J Exp Med, 2002. **196**(1): p. 23-32.
190. Waisberg, M., et al., *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicology, 2003. **192**(2-3): p. 95-117.
191. Ercal, N., H. Gurer-Orhan, and N. Aykin-Burns, *Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage*. Curr Top Med Chem, 2001. **1**(6): p. 529-39.
192. Leonard, S.S., G.K. Harris, and X. Shi, *Metal-induced oxidative stress and signal transduction*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(12): p. 1921-42.
193. Pegoraro, S., et al., *Isomorphous replacement of cystine with selenocystine in endothelin: oxidative refolding, biological and conformational properties of [Sec3,Sec11,Nle7]-endothelin-1*. J Mol Biol, 1998. **284**(3): p. 779-92.
194. Kramer, G.F. and B.N. Ames, *Isolation and characterization of a selenium metabolism mutant of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1988. **170**(2): p. 736-43.
195. Jacob, C., W. Maret, and B.L. Vallee, *Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1910-4.
196. Ananyev, G.M., et al., *Remarkable affinity and selectivity for Cs<sup>+</sup> and uranyl (UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>) binding to the manganese site of the apo-water oxidation complex of photosystem II*. Biochemistry, 1999. **38**(22): p. 7200-9.
197. Tuve, T. and H.H. Williams, *Metabolism of selenium by Escherichia coli: biosynthesis of selenomethionine*. J Biol Chem, 1961. **236**: p. 597-601.
198. Daniels, L.A., *Selenium metabolism and bioavailability*. Biol Trace Elem Res, 1996. **54**(3): p. 185-99.
199. Sies, H., *Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic*. Free Radic Biol Med, 1993. **14**(3): p. 313-23.
200. Levander, O.A., V.C. Morris, and D.J. Higgs, *Selenium as a catalyst for the reduction of cytochrome c by glutathione*. Biochemistry, 1973. **12**(23): p. 4591-5.
201. Levander, O.A., V.C. Morris, and D.J. Higgs, *Acceleration of thiol-induced swelling*

of rat liver mitochondria by selenium. *Biochemistry*, 1973. **12**(23): p. 4586-90.

202. Maiorino, M., et al., *Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the SE-peroxidase*. *J Biol Chem*, 2005.
203. Su, D., et al., *Mammalian selenoprotein thioredoxin/glutathione reductase: Roles in disulfide bond formation and sperm maturation*. *J Biol Chem*, 2005.
204. Moskovitz, J., *Roles of methionine sulfoxide reductases in antioxidant defense, protein regulation and survival*. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(11): p. 1451-7.
205. Forchhammer, K., et al., *Selenocysteine synthase from Escherichia coli. Nucleotide sequence of the gene (selA) and purification of the protein*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(10): p. 6318-23.
206. Forchhammer, K. and A. Bock, *Selenocysteine synthase from Escherichia coli. Analysis of the reaction sequence*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(10): p. 6324-8.
207. Leinfelder, W., et al., *Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine*. *Nature*, 1988. **331**(6158): p. 723-5.
208. Leinfelder, W., et al., *In vitro synthesis of selenocysteinyl-tRNA(UCA) from seryl-tRNA(UCA): involvement and characterization of the selD gene product*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(2): p. 543-7.
209. Veres, Z., et al., *Synthesis of 5-methylaminomethyl-2-selenouridine in tRNAs: 31P NMR studies show the labile selenium donor synthesized by the selD gene product contains selenium bonded to phosphorus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(7): p. 2975-9.
210. Forchhammer, K., W. Leinfelder, and A. Bock, *Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein*. *Nature*, 1989. **342**(6248): p. 453-6.
211. Cekan, E., B. Tribukait, and H. Vokal-Borek, *Protective effect of selenium against ionizing radiation-induced malformations in mice*. *Acta Radiol Oncol*, 1985. **24**(3): p. 267-71.
212. Emonet, N., et al., *Thiols and selenium: protective effect on human skin fibroblasts exposed to UVA radiation*. *J Photochem Photobiol B*, 1997. **40**(1): p. 84-90.
213. Rafferty, T.S., et al., *Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death*. *Biochem J*, 1998. **332** (Pt 1): p. 231-6.

214. Kadiiska, M.B. and R.P. Mason, *In vivo copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2002. **58**(6): p. 1227-39.
215. Ulusu, N., et al., *Inhibition of glutathione reductase by cadmium ion in some rabbit tissues and the protective role of dietary selenium*. Biol Trace Elem Res, 2003. **91**(2): p. 151-6.
216. Terry, N., et al., *Selenium In Higher Plants*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000. **51**: p. 401-432.
217. Hamilton, S.J., *Review of selenium toxicity in the aquatic food chain*. Sci Total Environ, 2004. **326**(1-3): p. 1-31.
218. Gopalakrishna, R., Z.H. Chen, and U. Gundimeda, *Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion*. Arch Biochem Biophys, 1997. **348**(1): p. 37-48.
219. Park, H.S., et al., *Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8487-91.
220. Bergad, P.L. and W.B. Rathbun, *Inhibition of Na,K-ATPase by sodium selenite and reversal by glutathione*. Curr Eye Res, 1986. **5**(12): p. 919-23.
221. Kim, I.Y. and T.C. Stadtman, *Inhibition of NF-kappaB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12904-7.
222. Carlouz, A. and D. Touati, *Isolation of superoxide dismutase mutants in Escherichia coli: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?* Embo J, 1986. **5**(3): p. 623-30.
223. Gralla, E.B. and J.S. Valentine, *Null mutants of Saccharomyces cerevisiae Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates*. J Bacteriol, 1991. **173**(18): p. 5918-20.
224. Culotta, V.C., *Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism*. Curr Top Cell Regul, 2000. **36**: p. 117-32.
225. Loewen, P.C., *Isolation of catalase-deficient Escherichia coli mutants and genetic mapping of katE, a locus that affects catalase activity*. J Bacteriol, 1984. **157**(2): p. 622-6.
226. Loewen, P.C., et al., *Genetic mapping of katG, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1985. **162**(2): p. 661-7.

227. Ellis, H.R. and L.B. Poole, *Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium*. Biochemistry, 1997. **36**(43): p. 13349-56.
228. Broer, S., et al., *Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of Staphylococcus aureus plasmid pI258*. J Bacteriol, 1993. **175**(11): p. 3480-5.
229. Ji, G. and S. Silver, *Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of Staphylococcus aureus plasmid pI258*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9474-8.
230. Rosenstein, R., et al., *Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of Staphylococcus xylosus plasmid pSX267*. J Bacteriol, 1992. **174**(11): p. 3676-83.
231. Stolz, J.F., P. Basu, and R.S. Oremland, *Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium*. Int Microbiol, 2002. **5**(4): p. 201-7.
232. Ji, G., et al., *Arsenate reductase of Staphylococcus aureus plasmid pI258*. Biochemistry, 1994. **33**(23): p. 7294-9.
233. Liu, J. and B.P. Rosen, *Ligand interactions of the ArsC arsenate reductase*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21084-9.
234. Zegers, I., et al., *Arsenate reductase from S. aureus plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(10): p. 843-7.
235. Teplyakov, A., et al., *Crystal structure of the YffB protein from Pseudomonas aeruginosa suggests a glutathione-dependent thiol reductase function*. BMC Struct Biol, 2004. **4**(1): p. 5.
236. Shi, J., et al., *Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from Escherichia coli shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36039-42.
237. Schottel, J.L., *The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1978. **253**(12): p. 4341-9.
238. Fox, B. and C.T. Walsh, *Mercuric reductase. Purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide*. J Biol Chem, 1982. **257**(5): p. 2498-503.
239. Schiering, N., et al., *Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from Bacillus sp. strain RC607*. Nature, 1991. **352**(6331): p. 168-72.
240. Krauth-Siegel, R.L. and R. Schoneck, *Flavoprotein structure and mechanism*. 5.

*Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design.* Faseb J, 1995. **9**(12): p. 1138-46.

241. Bhriain, N.N. and T.J. Foster, *Polypeptides specified by the mercuric resistance (mer) operon of plasmid R100.* Gene, 1986. **42**(3): p. 323-30.
242. Summers, A.O. and G.A. Jacoby, *Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob Agents Chemother, 1978. **13**(4): p. 637-40.
243. Osborn, A.M., et al., *The mercury resistance operon of the IncJ plasmid pMERPH exhibits structural and regulatory divergence from other Gram-negative mer operons.* Microbiology, 1996. **142** (Pt 2): p. 337-45.
244. Lund, P.A. and N.L. Brown, *Role of the merT and merP gene products of transposon Tn501 in the induction and expression of resistance to mercuric ions.* Gene, 1987. **52**(2-3): p. 207-14.
245. Griffin, H.G., et al., *Cloning and DNA sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(10): p. 3112-6.
246. Benison, G.C., et al., *A stable mercury-containing complex of the organomercurial lyase MerB: catalysis, product release, and direct transfer to MerA.* Biochemistry, 2004. **43**(26): p. 8333-45.
247. Nascimento, A.M., *Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments.* Genetic and Molecular Research, 2003. **2**(1): p. 92-101.
248. Brown, N.L., et al., *The nucleotide sequence of the mercuric resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: further evidence for mer genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system.* Mol Gen Genet, 1986. **202**(1): p. 143-51.
249. Inoue, C., K. Sugawara, and T. Kusano, *The merR regulatory gene in Thiobacillus ferrooxidans is spaced apart from the mer structural genes.* Mol Microbiol, 1991. **5**(11): p. 2707-18.
250. Luikenhuis, S., et al., *The yeast Saccharomyces cerevisiae contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(5): p. 1081-91.
251. Prentki, *Plasmid vector for selecting IS1-promoted deletions in cloned DNA: sequence analysis of the omega interposon.* Gene, 1991. **103**(1): p. 17-23.
252. Li, H., et al., *Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the*

*putative PerR regulon of Synechocystis sp. strain PCC 6803*. J Bacteriol, 2004. **186**(11): p. 3331-45.

253. Navarro, F. and F.J. Florencio, *The cyanobacterial thioredoxin gene is required for both photoautotrophic and heterotrophic growth*. Plant Physiol, 1996. **111**(4): p. 1067-75.
254. Komenda, J. and J. Masojidek, *Functional and structural changes of the photosystem II complex induced by high irradiance in cyanobacterial cells*. Eur J Biochem, 1995. **233**(2): p. 677-82.
255. Benedetti, S., et al., *Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga Aphanizomenon flos-aquae*. Life Sci, 2004. **75**(19): p. 2353-62.
256. Karimova, G., et al., *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5752-6.
257. Sztajnkrycer, M.D. and E.J. Otten, *Chemical and radiological toxicity of depleted uranium*. Mil Med, 2004. **169**(3): p. 212-6.
258. Arfsten, D.P., K.R. Still, and G.D. Ritchie, *A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development*. Toxicol Ind Health, 2001. **17**(5-10): p. 180-91.
259. Lopez-Maury, L., *Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803*. J. Bacteriol., 2003. **185**(18): p. 5363-71.
260. Mustacich, D. and G. Powis, *Thioredoxin reductase*. Biochem J, 2000. **346 Pt 1**: p. 1-8.
261. Gromer, S., et al., *A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase*. Biochem J, 1998. **332 (Pt 2)**: p. 591-2.
262. Carlberg, I. and B. Mannervik, *Glutathione reductase*. Methods Enzymol, 1985. **113**: p. 484-90.
263. Bjornstedt, M., et al., *Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems*. Biomed Environ Sci, 1997. **10**(2-3): p. 271-9.
264. Holmgren, A. and F. Aslund, *Glutaredoxin*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 283-92.
265. Noguera, V., et al., *NMR reveals a novel glutaredoxin-glutaredoxin interaction interface*. J Mol Biol, 2005. **353**(3): p. 629-41.
266. Lindhal, M., *Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different*. PNAS, 2003. **100**(26): p. 16107-12.



267. Gregus, Z. and B. Nemeti, *The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase works as an arsenate reductase in human red blood cells and rat liver cytosol*. Toxicol Sci, 2005. **85**(2): p. 859-69.
268. Debarbieux, L. and J. Beckwith, *Electron avenue: pathways of disulfide bond formation and isomerization*. Cell, 1999. **99**(2): p. 117-9.
269. Sambrook, V.D., Fritsch, E., Maniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989.
270. Powel, B., Mergeay, M., Christofy, N., *Transfer of broad-host-range plasmids to sulfate reducing bacteria*. FEMS Microbiol Lett, 1989. **59**: p. 269-274.
271. Hanahan, D., *Technique for transformation of E.coli in DNA cloning*. 1985: p. 121.
272. Fields, S., Song, O., *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**: p. 245-246.
273. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 1976. **72**: p. 248-254.
274. Delaunay, A., et al., *A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation*. Cell, 2002. **111**(4): p. 471-81.